

BIOCHEMISCHER TEST UND HLA-TYPISIERUNG
ZUR ERKENNUNG DER
HETEROZYGOTEN GENTRÄGER FÜR DAS
ADRENOGENITALE SYNDROM (AGS)

JOCHEN WEIL

1982

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0055

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

Biochemischer Test und HLA-Typisierung zur Erkennung der heterozygoten Genträger für das adrenogenitale Syndrom (AGS).

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Jochen Weil

aus

Rothenburg ob der Tauber

München 1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. D. Knorr

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. K. Betke

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 1982



Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	EINLEITUNG.	
I.	Aetiologie, Pathogenese und Häufigkeit des AGS.	1
II.	Notwendigkeit für einen Heterozygotentest und Ziel der vorliegenden Untersuchungen.	6
B.	BIOCHEMISCHER TEST ZUR ERKENNUNG DER HETEROZYGOTEN GENTRÄGER.	
I.	Bisherige Untersuchungen und Fragestellung.	8
II.	Material und Methoden. 1. Klinische Untersuchungen. 2. Steroidbestimmungen. 3. Statistik.	10
III.	Ergebnisse.	20
IV.	Diskussion.	26

C.	HLA-TYPISIERUNG ZUR ERKEN- NUNG DER HETEROZYGOTEN GEN- TRÄGER.	
I.	Einleitung.	31
II.	Übersicht über das HLA-System.	33
	1. Serologisch definierte HLA- Antigene.	
	2. Lymphozyten definierte HLA- Antigene.	
	3. Anordnung der HLA-Gene auf dem Chromosomen und benach- barte Gene.	
	4. HLA-System und Krankheits- assoziation.	
III.	Ziel der genetischen Untersu- chung.	49
IV.	Material und Methoden.	50
	1. Untersuchte Personen.	
	2. HLA-A, B-Typisierung.	
	3. HLA-D-Typisierung.	
V.	Ergebnisse.	53
VI.	Diskussion.	65
D.	ZUSAMMENFASSUNG.	71
E.	LITERATURVERZEICHNIS.	74

A. EINLEITUNG.

I. Aetiologie, Pathogenese und Häufigkeit des AGS.

Das kongenitale adrenogenitale Syndrom (AGS) ist als eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselstörung der Nebennierenrinde erkannt (22, 62). Nach den Untersuchungen von BONGIOVANNI et al. (19) ist diese Störung in etwa 90 % der Fälle durch einen Mangel der adrenalen C 21-Hydroxylase bedingt. Die anderen Enzymdefekte, die ebenfalls zu dem Krankheitsbild des kongenitalen AGS führen (11 β -Hydroxylase und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel), sind außerordentlich selten. Wegen der Seltenheit dieser beiden Enzymdefekte steht daher im folgenden der Begriff des "AGS" als Synonym für den C 21-Hydroxylasemangel.

Der Mangel der C 21-Hydroxylase hat eine Störung der Cortisol- und weniger häufig auch der Aldosteronbiosynthese zur Folge (Abb. 1). Je nach Ausmaß der Störung - d.h., ist die Produktion der Mineralocorticoide mit beeinträchtigt oder nicht - , unterscheidet man klinisch zwei verschiedene Erscheinungsformen des AGS: Die unkomplizierte Form sowie die Form mit Salzverlust . Der Anteil der Form mit Salzverlust am AGS insgesamt wird je nach Autoren zwischen 30 bis 50 % angegeben (17, 53, 61, 65). In einer Familie tritt die Erkrankung immer in der gleichen Form, entweder mit oder ohne Salzverlustsyndrom, auf.

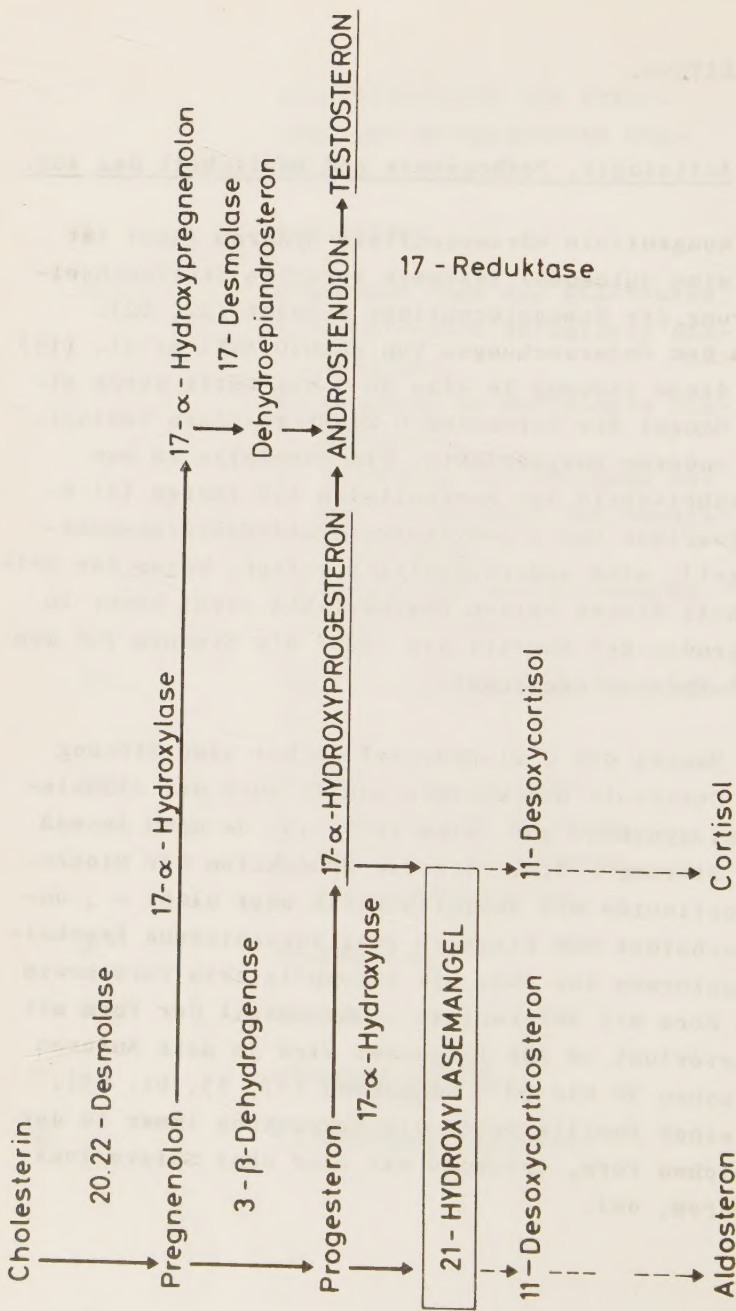


Abb. 1

Durch den C 21-Hydroxylasemangel bedingte Veränderung im Steroidmetabolismus der Nebennierenrinde.

Bis heute ist noch nicht endgültig entschieden, ob die beiden Erscheinungsformen des AGS durch einen Defekt von zwei verschiedenen C 21-Hydroxylasen oder durch eine quantitativ unterschiedliche Beeinträchtigung des selben Enzyms verursacht sind. Für diese letzte Hypothese sprechen Untersuchungen von BONGIOVANNI und EBERLEIN (20) und RÖSLER et al. (67), nach denen es keine klare Trennung zwischen den beiden Formen des AGS gibt, und nach denen auch bei der unkomplizierten Form latente Störungen der Mineralocorticosteroidsynthese vorliegen. Dagegen fanden PHAM-HUU-TRUNG et al. (58) bei der unkomplizierten Form des AGS eine normale bis erhöhte Aldosteronsekretion, was die schon früher geäußerte Hypothese von dem Defekt zweier unterschiedlicher C 21-Hydroxylasen (25, 36) - eine für den Stoffwechselweg des Cortisols und eine andere für den des Aldosterons - stützen würde.

Die durch den Enzymdefekt verminderte Cortisolproduktion beim AGS führt zu einer Störung des Regelkreises Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinde. Da die Sekretion des ACTH hauptsächlich durch die Höhe des Serumcortisolspiegels in einem Feed-back-Mechanismus reguliert wird, hat die verminderte Cortisolsynthese eine erhöhte ACTH-Ausschüttung zur Folge. Diese verstärkte ACTH-Sekretion führt zu einer Überstimulation der Nebennierenrinde, was sich morphologisch durch eine beidseitige Hyperplasie dieses Organs sowie biochemisch durch eine Anhäufung von Substraten vor dem Enzymblock ausdrückt (Abb. 1).

So ist beim C 21-Hydroxylasemangel die Konzentration des 17 α -Hydroxyprogesterons (17-OH-Prog.) im Plasma ungefähr 100-fach über die Norm erhöht. Ebenso werden die spezifischen Metabolite des 17-OH-Prog., das Pregnantriol und das Pregnantriolon, im Urin von AGS-Patienten vermehrt ausgeschieden.

Da der Stoffwechselweg der adrenalen Androgene durch den Enzymdefekt nicht in Mitleidenschaft gezogen ist, kommt es durch die erhöhte ACTH-Stimulation außerdem zu einer verstärkten Synthese der adrenalen Androgene, vor allem des Androstendions und des Testosterons (Abb. 1). Diese, schon während der Fetalzeit erhöhten Androgenproduktion führt beim Mädchen mit AGS zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten, antenatalen Virilisierung des äußeren Genitales (Pseudohermaphroditismus femininus) sowie in den darauffolgenden Lebensjahren ohne Behandlung zur Ausbildung einer heterosexuellen Pseudopubertas praecox.

Beim Jungen mit AGS ist dagegen die Symptomatik viel weniger ausgeprägt. Liegt nur die unkomplizierte Form dieser Stoffwechselstörung vor, so fallen die Jungen meistens nur durch einen vorzeitigen Pubertätseintritt auf, wobei aber die Hoden typischerweise infantil bleiben (isosexuelle Pseudopubertas praecox).

Liegt die Form des AGS mit Salzverlust vor, so kommt es bei beiden Geschlechtern in den ersten Lebenswochen zusätzlich zu gefährlichen Elektrolytstörungen, welche die Patienten in der Regel ohne entsprechende Therapie nicht überleben.

Die aetiotrope Therapie des AGS besteht in einer medikamentösen Substitution der fehlenden körpereigenen Corticosteroide.

Über die Häufigkeit des AGS liegen verschiedene Untersuchungen vor. Eine ungewöhnlich hohe Frequenz dieses Krankheitsbildes mit ungefähr 1:1500 fanden HIRSHFELD und FLEISHMAN (40) bei einzelnen Eskimostämmen. Dagegen war nach den Untersuchungen von CHILDS et al. (22) die Häufigkeit mit 1:67.000 im Staate Maryland für den Zeitraum 1939 bis 1955 deutlich geringer. Daß die Diagnose "AGS" in dieser Arbeit so viel seltener gestellt wurde, mag jedoch mit an den fehlenden laborchemischen Methoden während dieser Zeit zur Sicherung der Diagnose gelegen haben.

Im mitteleuropäischen Raum wird nach übereinstimmenden Untersuchungen von PRADER (61) und MAUTHE et al. (53) die Häufigkeit des AGS mit ca. 1:7.000 angegeben. Aus diesem Verhältnis errechnet sich nach dem Hardy-Weinberg'schen Gesetz die Frequenz der heterozygoten Genträger in einer normalen kaukasischen Population von ca. 1:40.

II. Notwendigkeit für einen Heterozygotentest und Ziel der vorliegenden Untersuchungen.

Als die Ursache für das AGS noch nicht erkannt war, und somit noch keine aetiotrope Therapie existierte, war die Mehrzahl der AGS-Patienten infertil, da die erhöhten Androgenspiegel supprimierend auf die LH-Sekretion wirkten. Heute kann jedoch der überwiegende Teil der AGS-Patienten unter einer adäquaten Substitutionstherapie mit Corticosteroiden fertil werden.

Immer häufiger fragen die Patienten selbst oder deren Eltern, wie groß das Risiko ist, homozygot erkrankte Nachfahren zu bekommen. Angesichts der überraschend hohen Heterozygotenhäufigkeit in unserer Bevölkerung ist es für die genetische Beratung dieser Familien dringend notwendig, die heterozygoten Genträger für das AGS sicher zu erkennen. Denn, sollte zum Beispiel der zukünftige Ehepartner des Patienten Merkmalsträger für diese Krankheit sein, wäre die Wahrscheinlichkeit von homozygot erkrankten Kindern 50 %.

Rein klinisch ist eine Unterscheidung zwischen heterozygoten und gesunden Individuen nicht möglich. Daher ist eine Methode zur sicheren Differenzierung zwischen heterozygoten und gesunden Personen dringend erforderlich. Die bisherigen Versuche zur Identifizierung der Merkmalsträger brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Erkennung der individuellen heterozygoten Genträger für das AGS zu verbes-

sern. Dies wurde auf zwei verschiedenen Wegen versucht:

1. Durch biochemische Untersuchungen, indem die vor dem Enzymblock gelegenen Substrate im Plasma bei mutmaßlich heterozygoten Genträgern und gesunden Kontrollpersonen nach der Stimulation der Nebennierenrinde bestimmt wurden.
2. Durch genetische Untersuchungen mittels der HLA-Typisierung. Neueste Untersuchungen lassen nämlich eine genetische Kopplung zwischen AGS und dem HLA-Blutgruppensystem vermuten.

B. BIOCHEMISCHER TEST ZUR ERKENNUNG DER HETEROZYGOTEN GENTRÄGER.

I. Bisherige Untersuchungen und Fragestellung.

Entsprechend dem autosomal rezessiven Erbgang des AGS wird ein Mangel der C 21-Hydroxylase klinisch nur dann manifest, wenn beide Allele des verantwortlichen Genes defekt sind (homozygot erkrankt). Im Gegensatz dazu ist bei den heterozygoten Genträgern nur eines der beiden Allele betroffen. Ein Krankheitswert kommt dieser Störung nicht zu. Bei den heterozygoten Genträgern ist die Aktivität der C 21-Hydroxylase noch ausreichend, eine Anschoppung der Substrate vor dem Enzymblock findet unter Normalbedingungen nicht statt. So fanden KNORR und BUTENANDT (45) keinen signifikanten Unterschied der basalen 17-OH-Prog.-Spiegel im Plasma zwischen heterozygoten und gesunden Personen. Ebenso war nach Untersuchungen von QUAZI et al. (64) eine Unterscheidung zwischen heterozygoten Merkmalsträgern und Kontrollpersonen durch die Bestimmung der Urinausscheidung von Pregnantriol

und anderer 11-oxygenierter-17-Ketosteroide unter physiologischen Bedingungen nicht möglich.

Unter Belastungsbedingungen des entsprechenden Stoffwechselweges wird jedoch eine latente Aktivitätsminderung des Enzyms deutlicher in Erscheinung treten. So müßte nach der Stimulation der Nebennierenrinde durch exogen zugeführtes ACTH eine Schwäche der C 21-Hydroxylierung durch einen Aufstau der Substrate vor dem Enzymblock manifest werden.

Verschiedene Untersuchungen, auf diesem Wege die heterozygoten Genträger von gesunden Kontrollpersonen zu unterscheiden, sind in den letzten Jahren bereits unternommen worden.

CHILDS et al. (22), GLEISPACH et al. (33), FIKENTSCHER (31) und HOMOKI et al. (41) bestimmten die Urinausscheidung von Pregnantriol und/oder Pregnantriolon bei Eltern von AGS-Kindern als den mutmaßlichen Heterozygoten und bei Kontrollpersonen. Sie fanden nach der Stimulation der Nebennierenrinde bei den AGS-Eltern eine signifikant höhere Ausscheidung dieser für das AGS spezifischen Metabolite als bei gesunden Personen.

KNORR et al. (46, 47), LEE und GAREIS (50), GUTAI et al. (35) und KRENSKY et al. (48) berichteten von einem signifikant größeren Anstieg des Plasmas 17-OH-Prog. nach der i.v.-Gabe von ACTH bei der Mehrzahl der Heterozygoten gegenüber Normalpersonen. Trotz dieser statistischen Unterschiede war aber die Identifikation der einzelnen Merkmalsträger sowohl mit Hilfe der Urinmetabolite wie der Plasmawerte nicht befriedigend. Es gab zum Teil beträchtliche

Überschneidung zwischen Heterozygoten- und Normalkollektiv.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Überschneidung der beiden Kollektive zu verringern und somit auf biochemischem Wege eine bessere Erkennung der individuellen heterozygoten Genträger zu erreichen. Dazu bestimmten wir neben dem Anstieg von 17-OH-Prog. zusätzlich den Anstieg von Androstendion, Testosteron und Cortisol im Plasma nach der ACTH-Stimulation bei AGS-Eltern und Kontrollpersonen. Zum anderen wurde eine verbesserte Erkennung der Heterozygoten versucht, indem bei einem Teil der untersuchten Personen die Nebennierenrinde vor der ACTH-Gabe mit Dexamethason (Dex.) supprimiert und der Test unter zeitlich genau standardisierten Bedingungen durchgeführt wurde.

II. Material und Methoden.

1. Klinische Untersuchungen.

Insgesamt wurden 71 Eltern von Kindern mit biochemisch gesichertem AGS und 60 gesunde erwachsene Kontrollpersonen untersucht. Das Einverständnis aller untersuchten Personen war vor dem Test eingeholt.

Bei allen getesteten Personen wurde die Nebennierenrinde durch exogen zugeführtes ACTH stimuliert. Die ACTH-Stimulation wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen - im weiteren als Test 1 und als Test 2 bezeichnet - durchgeführt.

Test 1: Die Nebennierenrinde wurde ohne medikamentöse Vorbehandlung stimuliert. Der ACTH-Test wurde ohne Berücksichtigung der Tageszeit und bei den Frauen unabhängig von der Zyklusphase durchgeführt.

43 AGS-Eltern und 30 Kontrollpersonen wurden auf diese Weise getestet.

Test 2: 1,5 mg Dex. (Fortecortin^R) wurde am Abend vor der ACTH-Stimulation um 22.00 Uhr oral verabreicht. Die ACTH-Stimulation erfolgte am nächsten Morgen um 9.00 Uhr. Frauen wurden nur zwischen dem 3. und 8. Tag ihres Menstruationszyklus getestet. Keine der untersuchten Personen erhielt eine Steroidmedikation, einschließlich der oralen Kontrazeptiva.

28 AGS-Eltern und 30 Kontrollpersonen wurden auf diese Weise getestet.

Die Nebennierenrindenstimulation erfolgte in Test 1 und Test 2 durch die i.v.-Injektion von 0,25 mg synthetischem ACTH 1-24 (Synacthen^R). Blut wurde in heparinisierten Röhrchen unmittelbar vor (basal) und 60 Minuten (stimuliert) nach der Injektion abgenommen. Das Plasma wurde sofort abzentrifugiert und bis zum Assay bei -20⁰ C aufbewahrt.

2. Steroidbestimmungen.

Die Plasmakonzentration von Cortisol, 17-OH-Prog., Androstendion und Testosteron wurden durch spezifische Radioimmunassays (RIA) bestimmt.

Der Gang einer radioimmunologischen Bestimmungsanalyse für Steroide ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Das Grundprinzip des RIA, der eine Form der kompetitiven Proteinbindungsanalyse darstellt, besteht in einer Konkurrenzreaktion radioaktiv markierter und nicht radioaktiver Moleküle der zu bestimmenden Substanz um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper. Dabei werden um so weniger radioaktiv markierte Moleküle (Tracer) am Antikörper gebunden, je mehr nicht markierte Moleküle des zu bestimmenden Steroids in dem biologischen Material vorhanden sind. Aus dem Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Tracer kann die Konzentration der gesuchten, nicht markierten Substanz berechnet werden. Da jedoch die Antikörper außer mit dem zu messenden Steroid noch mit

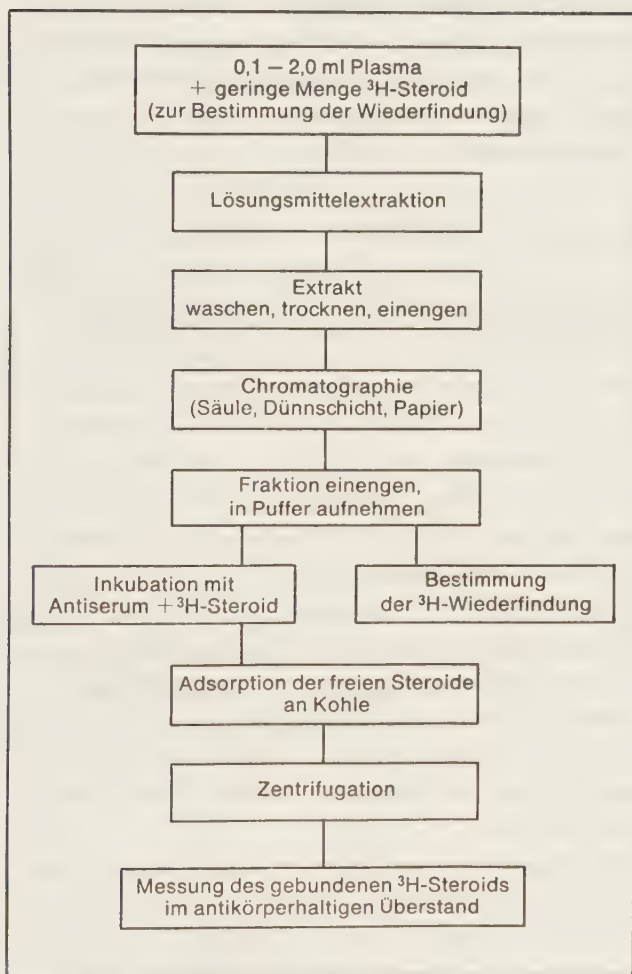


Abb. 2

Schematisch dargestellter Analysengang zur radio-immunologischen Bestimmung von Steroiden im Plasma.
(Aus BIDLINGMAIER und KNORR (15)).

anderen, ähnlich strukturierten Steroiden kreuzreagieren, ist vor der Bestimmung eine Extraktion und chromatographische Abtrennung des zu bestimmenden Steroids aus der biologischen Flüssigkeit notwendig.

Die Plasmakonzentration von 17-OH-Prog., Androstendion und Testosteron wurden durch radioimmunologische Methoden bestimmt, ähnlich denen, die von BIDLINGMAIER et al. (16) zur Messung der Plasma-Östrogene beschrieben wurden. Nach der Extraktion mit Äther erfolgte die chromatographische Trennung und Reinigung der entsprechenden Steroide über Sephadex LH-20 Säulen (Gel Bett 140 x 7 mm) mit einem Benzol/Äthanol-Gemisch (95:5) als Laufmittel.

Die anschließende radioimmunologische Bestimmung erfolgte durch hochspezifische Antikörper, die von Herrn Privat-Dozent Dr. BIDLINGMAIER durch Immunisierung von Kaninchen mit 17-OH-Prog.-C 3-BSA, Testosteron-C 3-BSA und Androstendion-C 6-BSA hergestellt wurden (BSA: Bovines Serum-Albumin).

Die Plasmakonzentration von Cortisol wurde nach der Methode von PHAM-HUU-TRUNG (59) nach Äther-Extraktion und anschließender Lösungsmittelverteilung (Tetrachlorkohlenstoff: H_2O) mit einem Antiserum bestimmt, welches nach Immunisierung mit Cortison-C 21-BSA erhalten wurde.

Aufarbeitungsverluste wurden bei allen Messungen durch Zugabe eines internen Standards ermittelt und gingen mit in die Berechnung der Konzentrationen ein.

Die Sensitivität der Methoden betrug für 17-OH-
Prog., Androstendion und Testosteron 3 ng/100 ml
und für Cortisol 0,3 µg/100 ml.

Die Intraassay-Reproduzierbarkeit für gepoolte
Plasmaproben von erwachsenen Frauen und Männern
lag zwischen 4,7 % für Testosteron und 7,1 % für
17-OH-Prog.

Die Interassay-Reproduzierbarkeit lag zwischen
5,1 % für Androstendion und 9,5 % für 17-OH-
Prog.

3. Statistik.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des non-parametrischen MANN-WHITNEY's U-Test (52). Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Kollektiven wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn sich ein P-Wert $< 0,01$ errechnete.

Test 1 (female)	Cortisol (μ g/100 ml)		Androstenedione (ng/100 ml)		17-OH-progesterone (ng/100 ml)		Testosterone (ng/100 ml)	
	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes
<i>0 min</i>								
Median value	18	16.4	97.5	109	67	70	24	26
Range	6.1-45.2	4.6-46.6	24-335	42-710	19-339	26-472	12-47	5.3-64
Significance	NS*		NS		NS		NS	
<i>60 min</i>								
Median value	35.6	40	199	202	242	418	29.5	34
Range	29-78.8	24.6-69	79-405	82-916	112-462	167-1530	20-47	10-59
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		NS	
<i>Increase</i>								
Median value	24.4	24.5	71.5	74	141	296	4.5	5
Range	7.8-42.1	14.4-37	14-176	20-268	80-252	69-1463	-2-13	-15-51.7
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		NS	

* NS = not significant.

Tabelle 1

Plasmakonzentrationen von 4 Steroiden bei Frauen (19 Kontrollpersonen und 24 AGS-Heterozygote) vor und nach ACTH-Stimulation ohne vorherige Dexamethason-Gabe (Test 1).

Test 2 (female)	Cortisol (μ g/100 ml)		Androstenedione (ng/100 ml)		17-OH-progesterone (ng/100 ml)		Testosterone (ng/100 ml)	
	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes
<i>0 min</i>								
Median value	1.6	1.3	68.5	87	33	35	19.5	22
Range	0.9-3.9	0.8-3.9	25-226	47-174	13-74	10-74	12-52	16-50
Significance	NS		NS		NS		NS	
<i>60 min</i>								
Median value	33.5	32	157	187	147	310	28.5	32
Range	26-66	22-45	42-289	104-366	103-253	218-711	20-64	24-70
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		NS	
<i>Increase</i>								
Median value	32.7	30.2	76.5	97	99.5	280	7	9.5
Range	24.5-55.7	21-42.7	12-147	10-192	7.5-222	203-687	2-16	-12-44
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		NS	

Tabelle 2

Plasmakonzentrationen von 4 Steroiden bei Frauen (16 Kontrollpersonen und 15 AGS-Heterozygote) vor und nach ACTH-Stimulation mit vorheriger Dexamethason-Suppression (Test 2).

Test 1 (male)	Cortisol ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)		Androstenedione ($\text{ng}/100\text{ ml}$)		17-OH-progesterone ($\text{ng}/100\text{ ml}$)		Testosterone ($\text{ng}/100\text{ ml}$)	
	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes
<i>0 min</i>								
Median value	15.4	14.9	161	124	161	136	550	460
Range	8.6-22.6	5.3-28.8	88-231	76-264	99-234	13-280	407-691	287-681
Significance	NS		NS		NS		NS	
<i>60 min</i>								
Median value	35	38.8	213	220	350	610	606	344
Range	27-46	23.5-49.2	87-397	115-398	167-385	298-2470	320-651	287-622
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		$2 P < 0.001$	
<i>Increase</i>								
Median value	19.7	23.7	69	69	143	474	38	-66
Range	14.5-28	8-30.8	38-166	28-201	16-247	58-2384	-144-133	-200-82
Significance	NS		NS		$P < 0.0005$		$2 P < 0.01$	

Tabelle 3

Plasmakonzentrationen von 4 Steroiden bei Männern (11 Kontrollpersonen und 19 AGS-Heterozygote) vor und nach ACTH-Stimulation ohne vorherige Dexamethason-Gabe (Test 1).

Test 2 (male)	Cortisol (μ g/100 ml)		Androstenedione (ng/100 ml)		17-OH-progesterone (ng/100 ml)		Testosterone (ng/100 ml)	
	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes	controls	heterozygotes
<i>0 min</i>								
Median value	1.4	1.4	97	86	133.5	104	543	439
Range	1-2.2	1-2.2	78-137	59-151	67-268	52-214	403-956	263-831
Significance		NS		NS		NS		NS
<i>60 min</i>								
Median value	31	31	182	180	238	387	560	396
Range	22-50	21-38	111-247	123-375	141-301	222-1743	305-963	243-720
Significance		NS		NS		$P < 0.005$		NS
<i>Increase</i>								
Median value	29.5	29.7	66	91	70	233	7	-41
Range	21.4-49.1	19-35.8	5-139	24-214	0-185	98-1636	-138-118	-219-187
Significance		NS		NS		$P < 0.0005$		NS

Tabelle 4

Plasmakonzentrationen von 4 Steroiden bei Männern (14 Kontrollpersonen und 13 AGS-Heterozygote) vor und nach ACTH-Stimulation mit vorheriger Dexamethason-Suppression (Test 2).

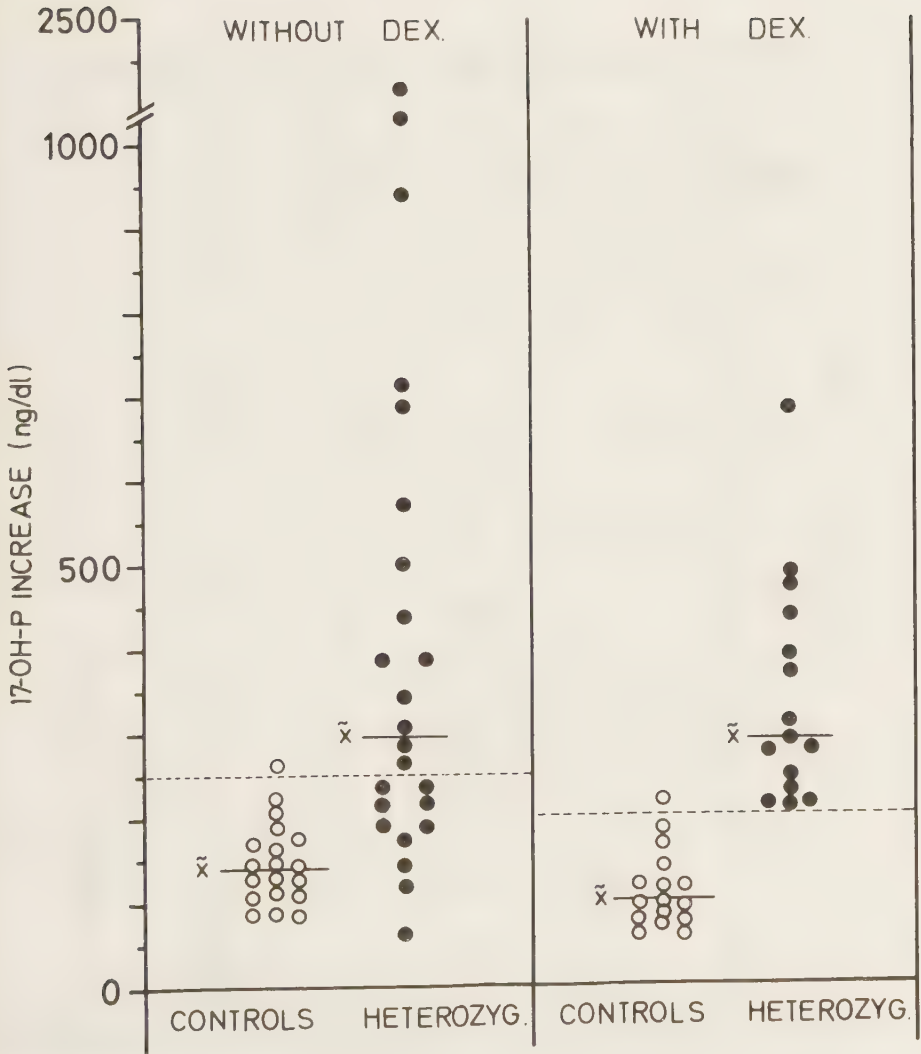
III. Ergebnisse.

Die Untersuchungsergebnisse wurden für Frauen und Männer getrennt ausgewertet. Die Plasmakonzentration des Cortisols, des Androstendions, des 17-OH-Prog. und des Testosterons wurden für die Frauen in Tabelle 1 und 2, für die Männer in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Die basalen Konzentrationen sowie die Anstiege (berechnet als Differenz zwischen basalem und stimuliertem Wert) des Plasma-Cortisols und des Androstendions nach der ACTH-Stimulation zeigten in Test 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede zwischen Heterozygoten und Kontrollpersonen. Dagegen lagen die Anstiege des Plasma 17-OH-Prog. nach der ACTH-Gabe bei den AGS-Eltern in beiden Testen signifikant höher als in den entsprechenden Kontrollgruppen ($p < 0,0005$), während die basalen 17-OH-Prog.-Spiegel sich statistisch nicht unterschieden.

Die individuellen Anstiege des Plasma 17-OH-Prog. nach ACTH wurden für die Frauen in Abb. 3 und für die Männer in Abb. 4 aufgetragen.

In den Kontrollgruppen lag sowohl bei den Frauen wie bei den Männern die Grenze von + 2 Standardabweichungen (SD) der 17-OH-Prog.-Anstiege nach ACTH bei 250 ng/100 ml in Test 1 bzw. bei 200 ng/100 ml in Test 2. Nahm man diesen Wert von + 2 SD der 17-OH-Prog.-Anstiege als Grenzwert zur Unterscheidung von Heterozygoten und mutmaßlich gesunden Personen an, so konnte in beiden Testen eine



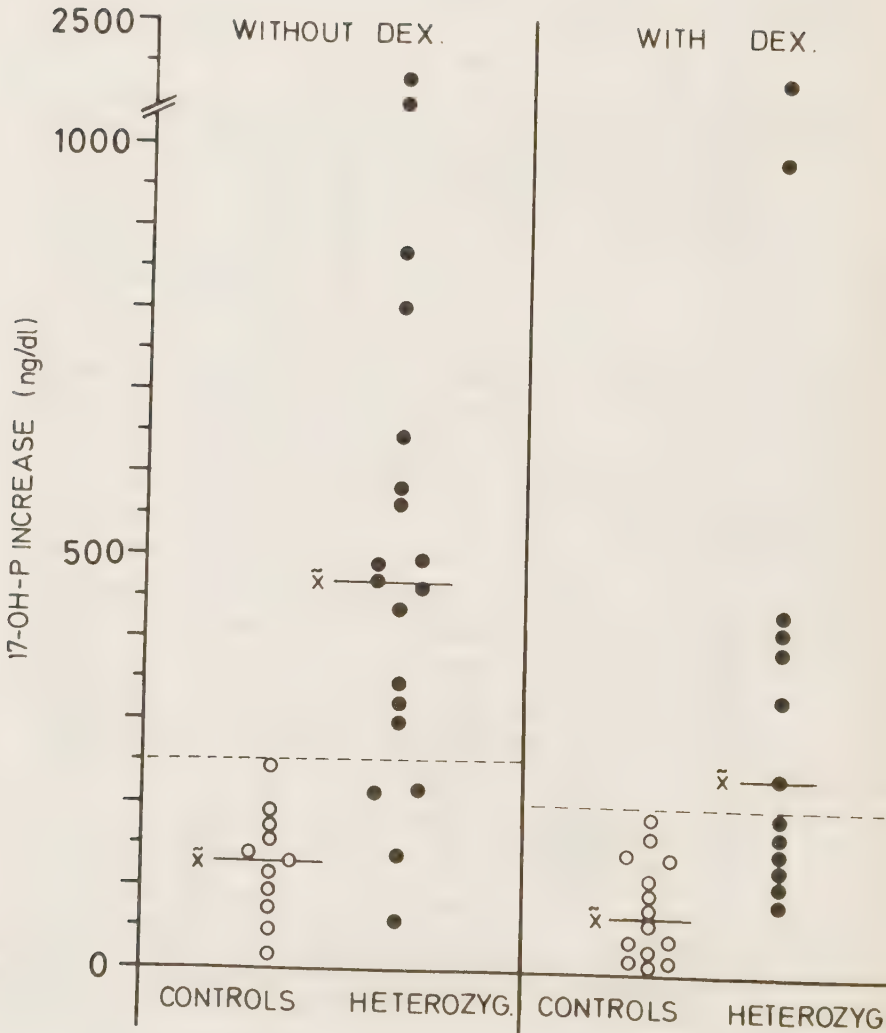


Abb. 4

Individuelle Anstiege des Plasma 17- α -Hydroxyprogesterons nach ACTH-Stimulation bei Männern ohne (Test 1) und mit (Test 2) vorheriger Gabe von Dexamethason (Dex.). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze von + 2 Standardabweichungen der 17- α -Hydroxyprogesteronanstiege in den entsprechenden Kontrollgruppen an.

unterschiedliche Anzahl von AGS-Eltern als heterozygot erkannt werden.

Bei den Frauen zeigten in Test 1 58 % (14 von 24) der AGS-Mütter bei einer Rate von 5 % (1/9) falsch positiver Ergebnisse und in Test 2 100 % (15/15) der AGS-Mütter bei einer Rate von 6 % (1/16) falsch positiver Resultate einen 17-OH-Prog.-Anstieg nach ACTH über die Grenze von + 2 SD der entsprechenden Kontrollgruppe.

Bei den Männern konnten in Test 1 79 % (15/19) der AGS-Väter bei einer Rate von 0 % (0/11) falsch positiver Ergebnisse und in Test 2 54 % (7/13) der Väter bei einer Rate von 0 % (0/14) falsch positiver Ergebnisse auf diese Weise als heterozygot erkannt werden.

Um zu versuchen, die individuell unterschiedliche Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde auf die ACTH-Stimulation zu eliminieren, wurde der Quotient des Anstiegs des Plasma 17-OH-Prog.: Anstieg des Plasma Cortisols errechnet. Durch die Anwendung dieses Quotienten konnte jedoch die Erkennung der Heterozygoten nicht weiter verbessert werden.

Die Plasmakonzentration des Testosterons zeigte bei den Frauen in Test 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede zwischen Heterozygoten und Kontrollpersonen. Dagegen waren bei den Männern in Test 1 die Testosteronkonzentration nach der ACTH-Stimulation bei den Heterozygoten signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen ($2 P < 0,01$). Wie aus der Abb. 5 zu entnehmen, fiel der Plasma-Testosteronspiegel

nach der Stimulation bei 13 von 17 (76 %) Heterozygoten in Test 1 ab, während es in der entsprechenden Kontrollgruppe bei 8 der 11 (72,5 %) Männer zu einem Testosteronanstieg kam.

Ein ähnlicher Trend, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede, war ebenfalls bei den Männern in Test 2 nachzuweisen.

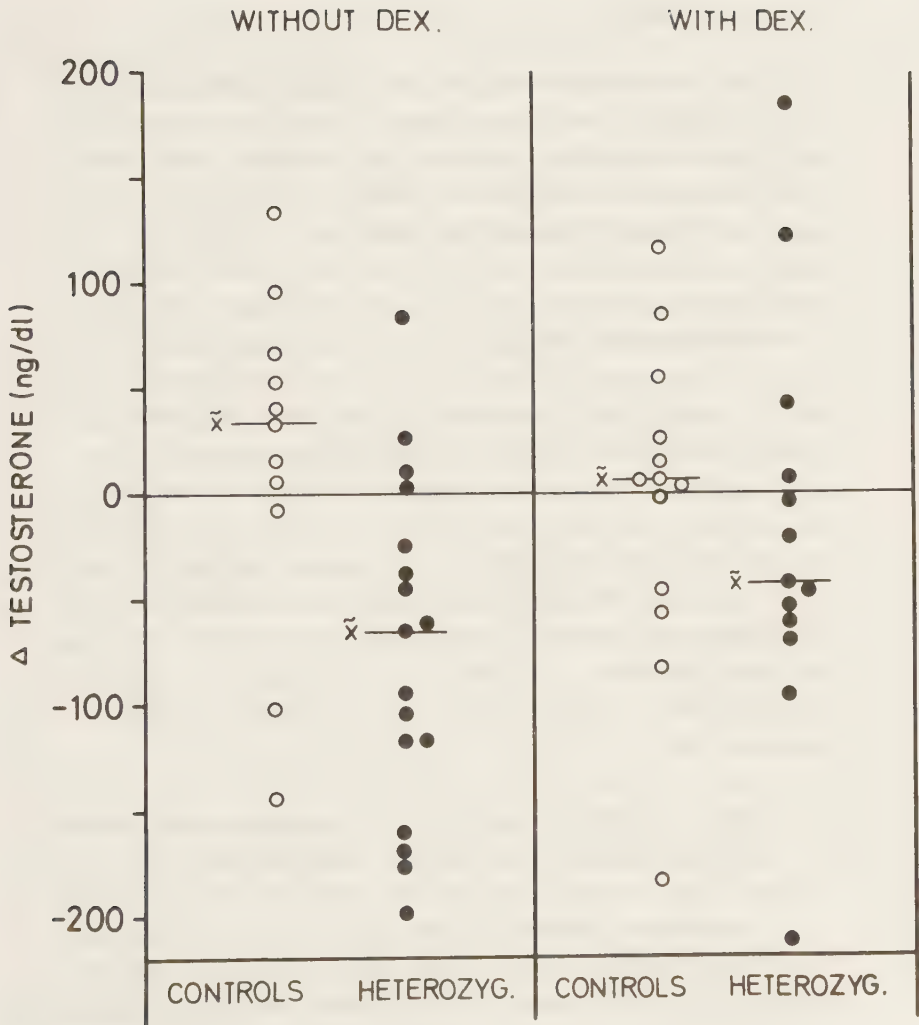


Abb. 5

Individuelle Veränderungen der Plasma Testosteronspiegel nach ACTH-Stimulation bei Männern ohne (Test 1) und mit (Test 2) vorheriger Gabe von Dexamethason (Dex.).

IV. Diskussion.

Die ersten Untersuchungen, die heterozygoten Gen-träger für das AGS durch einen über dem Normal-kollektiv liegenden Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. nach Nebennierenrinden-Stimulation mit ACTH zu identifizieren, waren von KNORR et al. (46, 47) und LEE und GAREIS (50) durchgeführt worden. Neuere Untersuchungen für einen biochemischen He-terozygotentest wurden erst vor kurzem von GUTAI et al. (35) und KRENSKY et al. (48) berichtet. GUTAI et al. (35) berechneten den kombinierten Anstieg des Plasma Progesterons und des 17-OH-Prog. nach der i.v.-Gabe von 1 mg ACTH und konnten da-durch 75 % der AGS-Eltern bei 2 % falsch positiver Resultate als heterozygot erkennen. KRENSKY et al. (48) konnten 60 Minuten nach der i.v.-Injektion von 25 Einheiten ACTH bei 77 % der mutmaßlichen Hetero-zygoten und bei 21 % der Kontrollpersonen einen Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. über 200 ng/100 ml nachweisen.

Wie unsere Untersuchungen an 4 verschiedenen Steroi-den im Plasma zeigten, war die Bestimmung des An-stiegs des Plasma 17-OH-Prog. nach der ACTH-Stimula-tion der beste Parameter, um zwischen AGS-Heterozy-goten und Normalpersonen zu unterscheiden. Die Be-stimmung des Cortisols, des Androstendions und des Testosterons im Plasma brachte keine weitere Verbes-erung des Testergebnisses.

Durch die vorherige Gabe von Dexamethason und durch die genaue zeitliche Standardisierung des Testes konnte jedoch bei den Frauen eine bessere Erkennung

der Heterozygoten erreicht werden (Abb. 3). Diese verbesserte Erkennung der weiblichen Heterozygoten in Test 2 im Vergleich zu Test 1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß der basale Funktionszustand der Nebennierenrinde bei all den untersuchten Personen besser vergleichbar war. In Test 1 sah man große Schwankungen der basalen Plasma Cortisolspiegel, was deutliche Unterschiede in der individuellen Nebennierenrindenfunktion anzeigte (Tabelle 1). Durch die vorherige Gabe von Dexamethason wurden diese Schwankungen so gut wie aufgehoben. Die basalen Plasma Cortisolspiegel waren bei allen untersuchten Personen in Test 2 auf einen vergleichbaren Ausgangswert supprimiert (Tabelle 2).

Eine weitere Maßnahme, die individuellen Unterschiede zwischen den untersuchten Personen zu verringern, bestand in einer genauen zeitlichen Standardisierung des Tests.

GIVENS et al. (32) berichteten von einer auffälligen Tagesrhythmik der Plasma 17-OH-Prog.-Spiegel bei gesunden erwachsenen Frauen. Sie fanden eine mittlere 17-OH-Prog.-Konzentration von 79 ng/100 ml zur Zeit des Cortisolpeaks am Morgen und eine von 42 ng/100 ml zur Zeit des Cortisoltiefpunkts am Abend. Zum Ausschluß solcher tageszeitlicher Schwankungen wurde die ACTH-Stimulation in Test 2 nur morgens um 9.00 Uhr durchgeführt.

ABRAHAM et al. (1) bestimmten die Konzentration des Plasma 17-OH-Prog. bei gesunden Frauen während des gesamten Menstruationszyklus. Sie fanden 17-OH-Prog.

Spiegel zwischen 20 bis 50 ng/100 ml während der Follikelphase, einen midcycle-peak von 200 ng/100 ml zur Zeit der Ovulation und Werte zwischen 100 bis 200 ng/100 ml während der Lutealphase.

In Test 2 wurden die Frauen nur zwischen dem 3. und 8. Tag ihres Menstruationszyklus getestet. In dieser Phase ist die Aktivität der Ovarien erniedrigt. Daher spiegeln die Plasma 17-OH-Prog.-Konzentrationen, die in dieser Zeit gemessen werden, stärker die adrenale als die ovarielle 17-OH-Prog.-Sekretion wider.

Bei den Männern dagegen konnte trotz vorheriger Suppression der Nebennierenrinde mit Dexamethason und trotz zeitlicher Standardisierung des Tests keine verbesserte Erkennung der Heterozygoten erreicht werden (Abb. 4). Dies weist darauf hin, daß die Beeinflussung des Tests durch gonadale Faktoren von Wichtigkeit ist.

Nach unseren Ergebnissen fiel der basale 17-OH-Prog. Spiegel im Plasma bei den Männern nach der Gabe von Dexamethason nur geringfügig ab (Tabelle 3 und 4). Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von VERMEULEN und VERDONCK (77), daß die basalen Plasma 17-OH-Prog.-Spiegel beim Mann fast ausschließlich testikulären Ursprungs sind. Die schlechtere Erkennung der Heterozygoten bei den Männern gegenüber den Frauen ist offensichtlich durch die andauernde Beeinflussung der adrenalen 17-OH-Prog.-Sekretion durch die testikuläre Produktion verursacht. Es liegt nun nahe, durch die zusätzliche Verabreichung von Androgenen die störende testikuläre Sekretion zu unterdrücken. In unserem Labor laufen zur Zeit Untersuchungen, ob durch die zusätzliche Gabe von

Androgenen oder von Cyproteronacetat (ein Gestagen-derivat mit antigonadotropen und antiandrogenen Effekten (57)) die Erkennung der männlichen Heterozygoten verbessert werden kann. Aussagekräftige Ergebnisse liegen jedoch noch nicht vor.

Der Abfall des Plasma Testosteronspiegels nach der ACTH-Stimulation bei der Mehrzahl der männlichen Heterozygoten in Test 1 im Gegensatz zu dem Testosteron-Anstieg bei der entsprechenden Kontrollgruppe war überraschend (Abb. 3). Andere Autoren berichteten ebenfalls von einem Testosteron-Abfall nach der Nebennierenrindenstimulation. BEITINS et al. (13) und DOERR und PRIKE (28) fanden einen signifikanten Abfall des Plasma Testosterons bei gesunden Männern 24 Stunden nach der Verabreichung von Depot-ACTH. Dieser Abfall war nicht durch eine Änderung der Plasma-LH-Konzentration verursacht (13). Als Mechanismus für die ACTH-induzierte Testosteron-suppression nahmen DOERR und PRIKE (29) eine durch Cortisol verursachte Unterdrückung des nächtlichen Testosteron-Anstieges an. GIVENS et al. (32) berichteten von einem Abfall des Plasma Testosterons bei hirsuten Frauen im Gegensatz zu einem geringen Testosteron-Anstieg bei den Kontrollpersonen 1 Stunde nach der i.v.-ACTH-Stimulation. Der Mechanismus für diese unterschiedliche Verhalten der Plasma Testosteronspiegel in beiden Kollektiven ist nicht bekannt. Nach unteren vorliegenden Ergebnissen war keine Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von Cortisol, 17-OH-Prog. und Androstendion einerseits und den von Testosteron andererseits nach der ACTH-Stimulation zu finden. Weitere Untersuchungen sind nötig, diese paradoxe Antwort des Testosterons auf ACTH zu erhärten und zu erklären.

Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden biochemischen Untersuchung kann man folgenden Schluß ziehen: Der ACTH-Stimulationstest zur Erkennung der heterozygoten Genträger für das AGS sollte bei den Frauen nach vorheriger Gabe von Dexamethason und zu den festgelegten Zeiten wie beschrieben in Test 2 durchgeführt werden. Bei den Männern dagegen bringt die vorherige Suppression der Nebennierenrinde keinen Vorteil. Der ACTH-Test sollte ohne medikamentöse Vorbehandlung wie in Test 1 beschrieben durchgeführt werden.

C. HLA-TYPISIERUNG ZUR ERKENNUNG DER HETEROZYGOTEN GENTRÄGER.

I. Einleitung.

Als HLA-System bezeichnet man einen Komplex von Antigenen, die beim Menschen außer auf der Zelloberfläche der Leukozyten (Human Leukocyte Antigen = HLA) auch auf den Plasmamembranen aller kernhaltiger Zellen nachzuweisen sind. Die Ausprägung dieser Zelloberflächenantigene wird kodiert durch ein hochpolymorphes Gensystem, welches auf dem Chromosom Nummer 6 lokalisiert ist. Beim Menschen sind bis jetzt 4 verschiedene, genetisch jedoch eng gekoppelte Genorte bekannt. Für jeden einzelnen dieser 4 Genorte wurde eine ganze Reihe von Allelen nachgewiesen.

Bei den HLA-Determinanten handelt es sich um Antigene, die bei dem Kontakt mit einem Individuum anderer Antigenstruktur von diesem als fremd erkannt werden und eine immunologische Abwehrreaktion hervorrufen. Die HLA-Antigene dienen somit der Unterscheidung von körpereigenen ("Selbst") und körperfremden Strukturen ("Nicht-Selbst").

Klinisch ist die Entdeckung der HLA-Determinanten vor allem für die Beurteilung der Gewebsverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Organtransplantationen von großer Wichtigkeit, nachdem man erkannt hatte, daß diese Determinanten als Transplantations-Antigene wirken. So berichteten CEPPELLINI et al. (21) und AMOS et al. (6), daß Hauttransplan-

tate zwischen HLA-identischen Geschwistern eine signifikant längere Überlebensdauer zeigten als zwischen HLA-nicht identischen Geschwistern. Die Überlebensdauer der Transplantate war dabei um so kürzer, je mehr Transplantations-Antigene inkompatibel waren. Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei den Nierentransplantationen gefunden (75), was darauf hinweist, daß beim Menschen das HLA-System das Haupthistokompatibilitätssystem (Major Histocompatibility System = MHS) darstellt. Bei weiteren Untersuchungen wurde jedoch deutlich, daß die Ergebnisse der Organtransplantation zwischen HLA-identischen, aber unverwandten Personen bei weitem nicht so gut waren wie zwischen HLA-identischen verwandten Personen. Dieses läßt den Schluß zu, daß neben dem bisher bekannten MHS noch andere, bisher noch nicht bekannte genetische Faktoren existieren, die für die Histokompatibilität zweier Personen entscheidend sind (Minor Histocompatibility System).

Bei den intensiven Forschungen über das HLA-System in den letzten Jahren wurde es weiterhin offenbar, daß noch andere Gene, die wichtige biologische Funktionen kodieren, innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des HLA-Genkomplexes lokalisiert sind (2, 76). Am überraschendsten war aber die Erkenntnis, daß die Empfänglichkeit für eine ganze Reihe von Krankheiten eng mit dem HLA-System assoziiert ist.

Die vorliegende Arbeit untersucht die genetische Kopplung zwischen AGS und dem HLA-System. Zum bes-

seren Verständnis dieser Untersuchung soll im folgenden der Aufbau und die Genetik des HLA-Systems sowie die Assoziation zwischen Krankheiten und dem HLA-System in Grundzügen beschrieben werden.

II. Übersicht über das HLA-System.

1. Serologisch definierte HLA-Antigene (HLA-A, B und C-Genorte).

Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Isoagglutininen des A B O-Blutgruppensystems werden die Antikörper gegen die Determinanten des HLA-Systems erst nach entsprechender Immunisierung gebildet. So konnten zuerst im Tierversuch nach der Abstoßung von Organtransplantaten stark zytotoxisch wirkende Antikörper im Serum des Empfängers nachgewiesen werden, die gegen die Antigene der Spenderlymphozyten gerichtet waren. Beim Menschen konnte als erster DAUSSET (23) im Serum schwangerer Frauen die Existenz solcher zytotoxischer Antikörper (Leukozytenagglutinine) nachweisen, die gegen die fetalen Leukozyten gerichtet waren. Im weiteren wurde versucht, durch Immunisierung spezifische Antiseren zu gewinnen, um so verschiedene Gruppen von Antigenen auf der Oberfläche der Leukozyten zu definieren. Die Immunisierung erfolgte auf drei verschiedene Weisen,

nämlich:

1. durch natürliche Immunisierung von Schwangeren, die durch foetomaternale Transfusion Antikörper gegen die differenten Antigene der fetalen Leukozyten bilden,
2. durch therapeutische Immunisierung wie zum Beispiel Bluttransfusion oder Organtransplantation,
3. durch gezielte Immunisierung von Freiwilligen durch Hauttransplantate oder subkutane Injektionen von Leukozyten, deren Antigenstruktur sich nur in einem Antigen von der des Spenders unterscheidet.

Im Gegensatz zur Untersuchung von Tieren mit genetisch genau definierten Inzuchtstämmen ist beim Menschen die Suche nach spezifischen homologen Antiseren ausgesprochen schwierig und zeitraubend. Da es sich beim Menschen in der Mehrzahl um multispezifische Antiseren handelt, ist eine Isolierung von spezifischen Seren nur möglich, indem eine riesige Anzahl von Zellen und verwandter Personen mit vielen verschiedenen, undefinierten Antiseren ausgetestet werden. Auf solch empirische Weise gelingt es jedoch, Seren zu gewinnen, deren Antikörper mit großer Wahrscheinlichkeit alle gegen das selbe Antigen gerichtet sind.

Im Laufe der letzten Jahre konnte durch die Gewinnung solcher spezifischer homologer Antisera eine Anzahl von verschiedenen HLA-Determinanten definiert werden. Anfangs nahm man an, daß die Expression der unterschiedlichen Antigene durch Allele eines einzigen Genortes kodiert würden. Diese Annahme erwies sich jedoch als falsch.

Der Beweis für die Existenz mehrerer Genorte konnte auf verschiedene Weise erbracht werden.

1. In einer allelischen Serie können nicht mehr als 2 Antigene auf einem Genort kodiert werden. Die meisten Menschen besitzen jedoch mehr als 2 serologisch nachweisbare HLA-Determinanten. Allein diese Tatsache sprach schon gegen das Vorhandensein nur eines einzigen Genortes.
2. Wie man aus der Genetik des A B O-Blutgruppensystems weiß, bedeutet eine signifikante negative Korrelation zweier Merkmale in einer nicht verwandten Population, daß beide Merkmale dem gleichen Genort als Allele angehören. Umgekehrt, eine positive Assoziation, daß beide Merkmale verschiedenen Genorten angehören. Durch solche statistische Rechnungen konnte ebenfalls die Existenz mehrerer HLA-Genorte nachgewiesen werden (3).
3. Der sicherste Beweis für die Existenz von mehreren Genorten stellt das Auftreten von Crossing-over dar.

Bei mehreren Familien konnten solche Rekombinationen zwischen den verschiedenen HLA-Merkmalen nachgewiesen werden (44, 69).

Bis heute sind 3 verschiedene, genetisch jedoch eng gekoppelte Genorte bekannt, die für die Ausprägung der serologisch definierten HLA-Determinanten verantwortlich sind. Entsprechend der WHO-Nomenklaturkonferenz von 1975 (78) werden diese als HLA-A, B und C-Genorte bezeichnet (Abb. 6).

Major Histokompatibilitäts-Koppelungsgruppe des Menschen

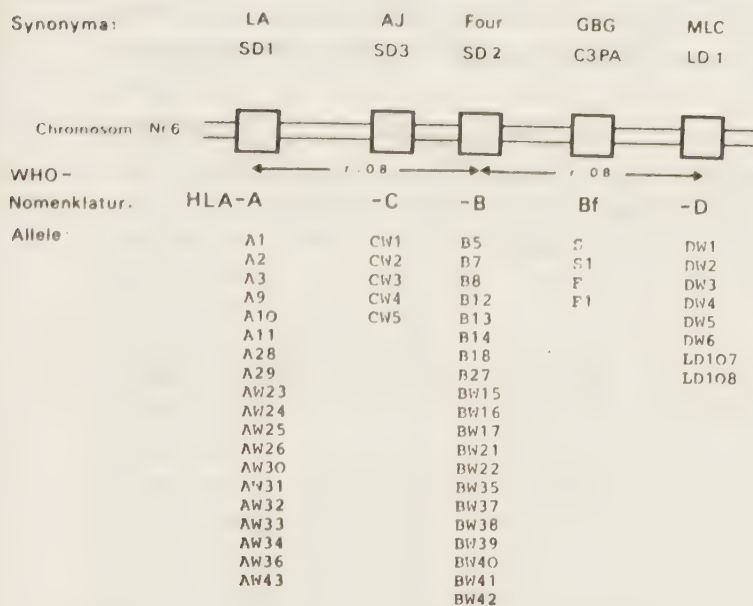


Abb. 6

Liste der offiziell anerkannten HLA-A, B, C und D-Antigene entsprechend der WHO-Nomenklatur (74).
(Abb. aus GROSSE-WILDE (34)).

Für jeden Genort sind eine Reihe von Allelen nachgewiesen, die mit arabischen Ziffern in aufsteigender Reihenfolge gekennzeichnet wurden. Das Suffix "w" hinter manchen Allelen bedeutet, daß die Spezifität dieses Antiserums, das zur Definition des Antigens führte, der nochmaligen Überprüfung durch einen der nächsten Histokompatibilitätsworkshops bedarf.

Die serologische Bestimmung der HLA-Determinanten erfolgt heute üblicherweise durch den Mikrozytotoxizitätstest, dessen Methode auf Seite 51 beschrieben ist.

Da in der HLA-Genetik die Begriffe "Phänotyp", "Genotyp" und "Haplotyp" immer wieder benutzt werden, sollen im folgenden kurz diese Begriffe definiert werden.

Unter dem "Phänotyp" eines Individuums versteht man die Summe aller erkennbaren Antigene, die von dem diploiden Chromosomensatz kodiert werden. Aus dem "Phänotyp" eines Individuums kann durch Familienanalyse der "Genotyp" bestimmt werden, der die Zusammengehörigkeit der einzelnen Antigene auf dem homologen Chromosomenpaar beschreibt. Ein "Genotyp" besteht aus zwei Untereinheiten, den beiden "Haplotypen". Als "Haplotyp" wird die Kombination der einzelnen Antigene auf dem haploiden Chromosomensatz (Gamet) definiert.

Ein herausragendes Merkmal des HLA-Systems ist das Auftreten von Kopplungsungleichgewichten.

Bei Untersuchungen über Phänotypen-, Gen- und Haplotypenfrequenz bemerkte man, daß häufig vorkommende Haplotypen nicht immer aus der Kombination häufig vorkommender Antigene entstehen. So zum Beispiel ist die Frequenz der Haplotypen HLA-A 1, B 8 in unserer Bevölkerung deutlich höher als man es von der Frequenz der einzelnen Antigene erwarten würde (3). Das weist darauf hin, daß zwischen einzelnen Antigenen der verschiedenen HLA-Genorte Kopplungsungleichgewichte (Linkage Disequilibrium) bestehen.

Ein statistisches Maß für ein Kopplungsungleichgewicht stellt der "Deltawert" dar, der sich aus der Differenz von erwarteter und beobachteter Haplotypenfrequenz berechnet (2, 3). Kopplungsungleichgewichte existieren nicht nur zwischen den Antigenen der HLA-A, B und C-Genorte, sondern auch zwischen diesen und anderen, eng mit dem HLA-System assoziierten Genen, zum Beispiel den Genen, die für die Disposition bestimmter Krankheiten verantwortlich sind.

Die Ursache für diese Kopplungsungleichgewichte sind noch nicht bekannt. Es werden verschiedene Mechanismen, wie selektiver Vorteil für bestimmte Haplotypen, genetische Drifts oder Mischung von Populationen, diskutiert (18, 26).

2. Lymphozyten definierte HLA-Antigene (HLA-D-Genort).

Lymphozyten haben die Fähigkeit, auf exogene Stimulation mit Blastentransformation und Zellteilung zu reagieren. Neben unbelebten Substanzen wie zum Beispiel Phytohämagglutinin (PHA) und anderen pflanzlichen Lektinen, können vor allem auch Antigene anderer Individuen der gleichen Spezies solch eine Reaktion der Lymphozyten hervorrufen (allogene Stimulation). Auf der Suche nach einem praktikablen in vitro-Test wurde zur Beurteilung der Histokompatibilität versucht, durch die Kokultivierung von Lymphozyten zweier Individuen eine Aussage über deren Gewebsverträglichkeit zu erhalten (7). Untersuchungen hierzu wurden von BACH et al. (8) und BAIN (12) durchgeführt, indem sie in der gemischten Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Culture = MLC) den Grad der Blastentransformation durch den Einbau von radioaktiv markierten Thymidin bestimmten. Eine Beschreibung dieser Methode ist auf Seite 52 gegeben.

Es zeigte sich in der Tat, daß der Grad der Blastentransformation eng mit der Histokompatibilität zweier Individuen gekoppelt war. So fand man zwischen HLA-identischen Geschwistern keine Stimulation der Lymphozyten in der MLC. Dagegen war bei HLA-nicht identischen Geschwistern eine Blastentransformation wie bei unverwandten Personen zu finden (5, 9). Dies führte zu der Annahme, daß die bereits bekannten HLA-A,

B und C-Antigene verantwortlich für die Stimulation der Lymphozyten in der MLC waren. Diese Annahme mußte jedoch durch die Beobachtung revidiert werden, daß HLA-identische, jedoch nicht verwandte Personen in 9 von 10 Paaren eine deutliche Lymphozytenstimulation zeigten (56). Ebenso konnten in einigen Familien HLA-identische Geschwister gefunden werden, die positiv in der MLC reagierten, während andere HLA-differente Geschwister keine Stimulation zeigten (55, 80). Diese Untersuchungen sprechen für die Existenz eines separaten MLC-Genortes, später als HLA-D-Genort bezeichnet, der eng mit den bisher bekannten Genorten gekoppelt ist.

Im Gegensatz zu den serologisch definierten HLA-Determinanten erfolgt die Typisierung der HLA-D-Antigene in der gemischten Lymphozytenkultur durch spezifische homozygote Referenzzellen. Entsprechend dem 7. Internationalen Histokompatibilitätsworkshop sind bis heute 6 verschiedene HLA-D-Determinanten definiert. Es ist jedoch zu erwarten, daß in nächster Zukunft noch weitere HLA-D-Antigene gefunden werden.

5. Anordnung der HLA-Genorte auf dem Chromosom und benachbarte Gene.

Durch verschiedene Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Gene des HLA-Systems auf dem Chromosom Nummer 6 lokalisiert sind. Als erste fanden LAMM et al. (49 a) durch Familienanalyse eine genetische Kopplung zwischen dem 3. Isoenzym der Phosphoglucomutase (PGM 3) und dem HLA-Gen-System. Durch Untersuchungen mit Zellhybriden konnte anschließend von VON SOMEREN (31) gezeigt werden, daß PGM 3 - und somit auch die HLA-Gene - auf dem Chromosom Nummer 6 lokalisiert sind.

Diese Lokalisation des HLA-Systems bestätigten LAMM et al. (49 b) durch die Entdeckung einer Familie, bei der alle 7 Familienmitglieder, die eine weite perizentrische Inversion des Chromosom Nummer 6 aufwiesen, auch in einem Haplotyp HLA-identisch waren.

Im Laufe der folgenden Jahre konnte weiterhin gezeigt werden, daß eine Reihe von Serumproteinen und Enzymen eng assoziiert mit dem HLA-System vererbt wird. So zum Beispiel wurden die Gene, die für die Expression der Komplementfaktoren C 2 und C 4 verantwortlich sind, in enger Nachbarschaft zum HLA-System gefunden. Ebenso wurde eine enge genetische Assoziation für die Gene nachgewiesen, die den Polymorphismus des Erythrozytenenzyms Glyoxylase (GLO) sowie des Properdinfaktors B kodieren. Der Properdinfaktor B , oder auch Bf genannt, ist für die

Komplementaktivierung ohne Antigen-Antikörperkomplex im alternativen Stoffwechselweg von Bedeutung.

Die Entdeckung von Rekombinationen zwischen den einzelnen Genen machte es möglich, die Lokalisation der Merkmale auf dem Chromosom anzugeben. Die wahrscheinliche Anordnung der Gene, die gekoppelt auf dem kurzen Arm des Chromosom Nummer 6 vererbt werden, ist in Abb. 10, Seite 67, dargestellt.

Als Maß für die Entfernung zwischen 2 Genorten nimmt man die Häufigkeit des Auftretens von Crossing-over an. Man geht dabei von der etwas vereinfachten Annahme aus, daß Chromosomen-Brüche zwischen 2 Genorten um so häufiger vorkommen, je weiter die beiden Genorte voneinander entfernt sind. So zum Beispiel berechnet sich eine Rekombinationsfrequenz zwischen den HLA-A und B-Genorten von 0,86 bis 0,96 %, was für eine sehr enge genetische Assoziation dieser beiden Genorte spricht (2). Die Berechnung der Rekombinationsfrequenz wird auch dazu benutzt, die Enge der genetischen Assoziation zwischen dem HLA-System und krankheitsdisponierenden Genen zu definieren.

4. HLA-System und Krankheitsassoziation.

Untersuchungen an Mäusen, die eine Assoziation zwischen einzelnen Antigenen der H 2-Region und Empfänglichkeit für bestimmte Krankheiten, zum Beispiel maligne oder virus-induzierte Erkrankungen, wahrscheinlich machen, gaben den Anstoß, auch beim Menschen die Assoziation zwischen dem HLA-Blutgruppensystem und Krankheiten zu untersuchen. Als erster berichtete AMIEL (4) von einer Kopplung zwischen HLA-Determinanten und dem Morbus Hodgkin. Im Laufe der folgenden Jahre wurden mehr als 100 Krankheiten auf ihre Beziehung zum HLA-System hin geprüft (24). Diese Untersuchungen wurden größtenteils an nicht verwandten Personen durchgeführt, indem die Häufigkeit der einzelnen HLA-Determinanten von den Patienten mit der von gesunden Kontrollpersonen verglichen wurde. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß eine ganze Anzahl von Erkrankungen eine reproduzierbare hochsignifikante Assoziation zu einzelnen Antigenen des HLA-Systems aufwiesen (Tabelle 5).

Die Assoziation mit den einzelnen HLA-Determinanten ist jedoch bei den verschiedenen Krankheiten unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein Maß für die Enge der Assoziation stellt das "relative Erkrankungsrisiko" dar, was angibt, um wieviel häufiger die untersuchte Krankheit bei Personen mit dem betreffenden Antigen zu finden ist, als bei Personen ohne dieses Antigen. So zum Beispiel ist das Risiko, an ankylosierender Spondylitis zu erkranken,

	HLA-Faktor	Relatives Risiko
Hämochromatose, idiop.	A 3	9,2
Ankylosierende Spondylitis	B 27	120,9
Reiter-Syndrom	B 27	40,3
Akute anteriore Uveitis	B 27	30,7
Juvenile rheumatoide Arthritis	B 27	11,5
Psoriasis-Arthritis	B 27	4,7
Psoriasis vulgaris	{ B 13	4,8
	{ B 17	5,0
	{ Cw 6	7,3
Zöliakie	B 8	8,3
Dermatitis herpetiformis	B 8	4,3
Myasthenia gravis	B 8, Dw 3	4,4; 3,5
Sjögren-Syndrom	B 8	3,0
Aktive chronische Hepatitis	B 8, Dw 3	3,6; 7,2
M. Graves	B 8, Dw 3	3,5; 4,0
M. Addison	B 8, Dw 3	6,4; 10,5
Juveniler Diabetes	B 8 } DRw 3	2,1 } 3,2
	B 18 }	2,5 }
	B 15, DRw 4	3,0; 3,6
Multiple Sklerose	B 7, Dw 2, DRw 2	1,4; 5,0; 6,2
M. Behçet	B 5	16
Rheumatoide Arthritis	Dw 4, DRw 4	6,6; 8,2

Tabelle 5

Korrelation von HLA-Determinanten und Krankheitsdisposition (nach DAUSSET aus "Diagnostik Aktuell" (27)).

ken, bei Personen mit HLA B 27 über 100-fach größer als bei Personen, die dieses Antigen nicht besitzen (Tabelle 5).

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, zeigen eine Reihe von vollkommen verschiedenen Krankheiten eine mehr oder minder stark ausgeprägte Assoziation mit dem HLA-System. Trotz dieser großen Heterogenität weisen diese Krankheiten doch bestimmte Gemeinsamkeiten auf. So ist es bei all den aufgeführten Erkrankungen bekannt, daß sie familiär gehäuft auftreten. Die Manifestation folgt jedoch nicht streng den Mendel'schen Gesetzmäßigkeiten. Außerdem ist die Ätiologie bei der Mehrzahl dieser Krankheiten nicht sicher bekannt. Bei vielen werden Autoimmunprozesse als Ursache angenommen.

Weiterhin ist aus der Tabelle 5 ersichtlich, daß Krankheiten, die man schon seit längerer Zeit als zusammengehörig betrachtet, auch eine Assoziation zu dem selben Antigen aufweisen. Das macht einen gemeinsamen genetischen Hintergrund dieser Erkrankungen sehr wahrscheinlich. So zum Beispiel sind die ankylosierende Spondylitis (Morbus Bechterew), die akute anteriore Uveitis, das Reitersyndrom und die juvenile rheumatoide Arthritis - alles Krankheiten des rheumatischen Formenkreises - jeweils signifikant mit dem Antigen HLA-B 27 korreliert.

Die Ursache für die Assoziation zwischen HLA-System und einer Reihe von Krankheiten ist bis heute noch nicht geklärt. Es werden jedoch verschiedene Mechanismen für diese Assoziation diskutiert.

Am wahrscheinlichsten ist die Annahme, daß die Gene, die für die Auslösung oder Empfänglichkeit von Krankheiten verantwortlich sind, eng assoziiert mit dem HLA-Gen-System vererbt werden und zu einzelnen HLA-Determinanten ein Kopplungsungleichgewicht aufweisen. Dies würde bedeuten, daß das HLA-System selbst gar nicht an dem Krankheitsgeschehen beteiligt ist, sondern vielmehr nur ein "Hinweisschild" für in der Nähe gelegene, krankheitsauslösende Gene darstellt (22, 15, 70, 72, 76).

Bei der Mehrzahl der HLA-assoziierten Krankheiten nimmt man immunologische Prozesse als Ursache für ihre Entstehung an. Es liegt daher nahe, in der Nähe des HLA-Genkomplexes Gene zu vermuten, die in irgendeiner Weise etwas mit der Immunantwort zu tun haben. Obwohl beim Menschen solche Gene bis jetzt mit Sicherheit noch nicht nachgewiesen wurden, so ist es jedoch in Analogie zu Untersuchungen an Mäusen sehr wahrscheinlich, daß solche Immunantwortgene (Ir-Gene) eng assoziiert mit dem HLA-System vererbt werden (54).

Untersucht man die Assoziation zwischen HLA-System und Krankheiten nicht wie bisher an unverwandten Personen, sondern die Segregation der Krankheit durch Familienanalysen, so wird deutlich, daß die Krankheit stärker mit dem gesamten Haplotypen als mit einzelnen HLA-Determinanten assoziiert ist. So fanden HARMS et al. (37) bei Familien mit Zöliakie, daß alle erkrankten Angehörigen einer Familie mindestens einen HLA-Haplotypen gemeinsam hatten. Die Krankheit segregierte dabei nicht mit dem Antigen, mit dem die Erkrankung in hohem Maße assoziiert ist.

Auf der anderen Seite waren nicht alle Familienangehörigen, die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem Patienten waren, auch an Zöliakie erkrankt; dies läßt vermuten, daß bei vielen Krankheiten neben den HLA-assoziierten Genen noch andere Faktoren wie Geschlecht, Alter, Umwelteinflüsse usw., notwendig sind, damit die Krankheit manifest wird.

III. Ziel der genetischen Untersuchung.

Erst kürzlich berichteten DUPONT et al. (30) erstmals von einer engen genetischen Assoziation zwischen dem HLA-System und dem AGS. In einer Studie an 6 Familien fanden sie, daß alle an AGS erkrankten Kinder in einer Familie HLA-identisch waren, während sich die gesunden Geschwister in mindestens 1 Haplotypen von den Patienten unterschieden. Weiterhin konnten sie durch den Nachweis eines Crossing-over bei einem AGS-Patienten zeigen, daß das für den C 21-Hydroxylasemangel verantwortliche Gen mit dem HLA-B-Genort segregierte und durch Rekombination von HLA-A getrennt werden konnte.

Diese Befunde von DUPONT et al. (30) regten uns zu weiteren Studien über die Kopplung von HLA-System und AGS an. Das Ziel der vorliegenden genetischen Studie, die in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. GROSSE-WILDE (München/Essen) und Herrn Prof. ALBERT (München) durchgeführt wurde, war

1. die Assoziation zwischen HLA-System und AGS an einer größeren Anzahl von Familien mit mindestens einem AGS-Kind zu untersuchen. Insbesondere sollte geprüft werden, inwieweit neben der Kopplung zum HLA-System als ganzen ein Kopplungsungleichgewicht zu einzelnen HLA-Antigenen vorliegt.

2. zu untersuchen, inwieweit eine Erkennung der heterozygoten Genträger in den AGS-Familien durch die HLA-Typisierung möglich ist.

Um dieses Ziel zu erreichen, untersuchten wir eine größere Anzahl von AGS-Familien, deren Angehörige teilweise bis in die dritte Generation verfolgt werden konnten. Neben der HLA-Typisierung wurden bei allen Angehörigen der AGS-Patienten auch unser biochemischer Test zur Erkennung der AGS-Heterozygoten durchgeführt. Das Ergebnis dieser beiden Testmethoden zur Erkennung der Heterozygoten wurde anschließend miteinander verglichen.

IV. Material und Methoden.

1. Untersuchte Personen.

Insgesamt wurden 91 Angehörige aus 17 Familien mit mindestens einem AGS-Kind untersucht. Unter diesen untersuchten Personen waren 27 Kinder mit biochemisch gesichertem AGS, von denen 16 die unkomplizierte Form und 11 die Form mit Salzverlust hatten. Bei 6 der 17 Familien waren mehr als ein Kind an AGS erkrankt.

2. Biochemischer Test zur Erkennung der heterozygoten Genträger.

Die Durchführung dieses biochemischen Testes wurde in Abschnitt B, II. der vorliegenden Arbeit genau beschrieben. Entsprechend den Ergebnissen dieser Untersuchung führten wir bei den Frauen den ACTH-Stimulationstest nach vorheriger Dexamethason-Suppression und zu genau festgelegten Zeiten wie beschrieben in Test 2 durch. Bei den Männern dagegen erfolgte die ACTH-Stimulation ohne vorherige Dexamethasongabe wie beschrieben in Test 1.

3. HLA-A, B-Typisierung.

Die serologische Bestimmung der Antigene dieser beiden Genorte erfolgte im Labor von Prof. ALBERT (Kinderpoliklinik der Universität München) durch den allgemein üblichen Mikrozytotoxizitätstest, wie er zuerst von TERASAKI und Mc CLELLAND (74) beschrieben wurde. Dabei wurden je 1 μ l reine Lymphozytensuspension mit je 1 μ l verschiedener, hoch spezifischer Antiseren unter Zugabe von Complement bei Zimmertemperatur inkubiert. Zum Schutz vor Verdunstung fand die ganze Reaktion unter einem dünnen Film Paraffinöl statt. Nach 90 Minuten wurden die Lymphozyten mit Formalin fixiert und mit Eosin angefärbt. Bei Vorliegen einer Antigen-Antikörperreaktion kam es unter Bindung von Complement zur Zytolyse, die im Phasenkontrastmikroskop festgestellt werden konnte.

3. HLA-D Typisierung.

Die Bestimmung der verschiedenen Antigene des HLA-D Locus wurde im Labor von Prof. GROSSE-WILDE (Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München) in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC = Mixed Lymphocyte Culture) durchgeführt, deren Prinzip von HARTZMAN et al. (38, 39) und BAIN (12) beschrieben wurde. Dabei wurden die Lymphozyten zweier Individuen für 4 bis 5 Tage miteinander kultiviert. Bei unterschiedlicher Antigenstruktur werden die Lymphozyten zu Blastentransformation und Zellteilung angeregt, deren Grad durch den Einbau von radioaktiv markierten DNS-Bausteinen, zum Beispiel ^3H -Thymidin, gemessen werden kann. Da sich bei einer allogenen Reaktion beide Zellpopulationen sich gegenseitig stimulieren (Two-way-MLC), ist es nicht möglich, die Reaktion der einen Zellpopulation von der der anderen zu trennen. Durch die vorherige Röntgenbestrahlung oder Inkubation mit dem Zytostatikum Mitomycin C kann jedoch jeweils eine Zellpopulation daran gehindert werden, bei einer allogenen Interaktion mit einer Blastentransformation zu reagieren (10, 43). Diese vorbehandelten Zellen behalten aber trotzdem die Fähigkeit, andere Zellen zu stimulieren. Auf diese Weise erhält man sogenannte "One-way-MLC" mit einer vorbehandelten Zellpopulation als Stimulatoren und einer unbehandelten Zellpopulation als Responder.

Bei unserer Untersuchung wurden auf diese Weise die Antigene Dw 1, Dw 2, Dw 3 und Dw 9 bestimmt.

V. Ergebnisse.

In der Tabelle 6 wurden die Ergebnisse der HLA-Typisierung von den Eltern und Kindern der 17 untersuchten Familien zusammengefaßt. Die beiden väterlichen HLA-Haplotypen wurden dabei mit dem Buchstaben a/b, die beiden mütterlichen mit dem Buchstaben c/d abgekürzt. Wie aus der Tabelle 6 zu ersehen, waren in allen Familien, die 2 Kinder mit AGS hatten (Familie 06, 10, 12, 13, 14, 15), die beiden an AGS erkrankten Geschwister HLA-identisch. Dagegen unterschieden sich die klinisch gesund erscheinenden Geschwister in allen untersuchten Familien in mindestens einem Haplotyp von dem AGS-Patienten.

Diese Beobachtung ließ schon eine genetische Kopplung zwischen dem HLA-Genystem und dem für den C 21-Hydroxylasemangel verantwortlichen Gen vermuten. Durch die Berechnung der Lod Scores (66), die ein statistisches Maß für die Enge der

Tabelle 6

Ergebnis der HLA-Typisierung bei den Eltern und Kindern der 17 untersuchten AGS-Familien. Bei den Kindern wurde die Diagnose "Heterozygot" oder "Homozygot gesund" entsprechend den Ergebnissen des biochemischen Heterozygotentest gestellt.

HLA phenotypes				$C2I^0/C2I^0$	$C2I^0/C2I^*$	$C2I^*/C2I^*$
01	F	a/b	A-,B22 A1,B8	1 a/c	2 b/c	
	M	c/d	A2,B7 A33,B38			
02	F	a/b	A32,B7 A29,B44	1 a/c		1 b/d
	M	c/d	A2,B27 A2,B27			
03	F	a/b	A31,B7 A1,B7	1 a/c		1 b/d
	M	c/d	A32,B35 A2,B16			
04	F	a/b	A2,B5 A26,B27	1 a/c	1 a/d	
	M	c/d	A2,B7 A9,B40		1 b/c	
05	F	a/b	A3,B35 A1,B8	1 a/c	2 b/c	
	M	c/d	A3,B40 A2,B27		1 a/d	
06	F	a/b	A2,B44 A3,B-	2 a/c		
	M	c/d	A24,B14 A3,B7			
07	F	a/b	A25,B35 A1,B8	1 a/c	2 b/c	
	M	c/d	A3,B8 A-,B44			
08	F	a/b	A2,B15 A28,B15	1 a/c		1 b/c [†]
	M	c/d	A2,B5 A1,B17			
09	F	a/b	A28,B15 A11,B21	1 a/c	1 a/d	
	M	c/d	A3,B5 A-,B7			
10	F	a/b	A24,B5 A32,B40	2 a/c [‡]		1 b/c [†]
	M	c/d	A3,B40 A2,B44			1 b/d
11	F	a/b	A2,B5 A26,B21	1 a/c	1 a/d	
	M	c/d	A3,B7 A2,B44			
12	F	a/b	A3,B15 A25,B5	2 a/c		
	M	c/d	A28,B14 A2,B8			
13	F	a/b	A2,B44 A24,B-	2 a/c		
	M	c/d	A3,B5 A24,B5			
14	F	a/b	A2,B44 A3,B40	2 a/c		1 b/c [†]
	M	c/d	A3,B5 A24,B5			1 b/d
15	F	a/b	A1,B5 A2,B-	2 a/c		
	M	c/d	A29,B44 A1,B8			
16	F	a/b	A9,B40 A-,B18	1 a/c	1 b/c	
	M	c/d	A3,B35/A29,B44			
17	F	a/b	A2,B7 A1,B8	1 a/c	a/d	
	M	c/d	A24,B15 A24,B-			

* $C2I^0/C2I^0$ = CAH patient with biochemically established diagnosis;

$C2I^0/C2I^*$ = CAH carrier detected by the CAH heterozygosity test,

$C2I^*/C2I^*$ = normal individual according to the CAH heterozygosity test.

[†] False-negative heterozygote test or CAH/HLA crossover.

[‡] Possibly monozygotic twins.

Assoziation zweier Genorte darstellen, wurde diese Vermutung bestätigt. Nach unseren Berechnungen betrug die Summe der Lod Scores der 17 untersuchten Familien 3.439, was für eine Rekombinationsfrequenz zwischen den beiden untersuchten Genorten von nur 0 bis 5 % sprach (Tabelle 7).

	0.000	0.050	0.100	0.200	0.300	0.400
m*	2.745	2.180	1.845	1.176	0.581	0.075
f*	0.694	0.715	0.673	0.482	0.252	0.069
Σ	3.439	2.895	2.518	1.657	0.833	0.144

* m = male, f = female

Tabelle 7

Summe der z_{12} Lod Scores zur Berechnung der genetischen Assoziation zwischen dem HLA-Genesystem und dem C 21-Hydroxylase Defektgen.

Bei allen untersuchten Familienangehörigen der AGS-Patienten wurde neben der HLA-Typisierung auch unser biochemischer Test zur Erkennung der heterozygoten Genträger durchgeführt. Wie in Teil B der vorliegenden Untersuchung beschrieben, wurden die heterozygoten Genträger biochemisch definiert durch einen Anstieg des Plasma 17 α -Hydroxyprogesterons (17-OH-Prog.) nach der ACTH-Stimulation, der oberhalb der Grenze von + 2 Standardabweichungen (SD) der entsprechenden Kontrollgruppe lag.

Beispiele für die Ergebnisse der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests zur Erkennung der AGS-Heterozygoten bei den Familienanalysen wurden in den Abb. 7 bis 9 gegeben.

In Abb. 7 wurde eine der fünf Familien dargestellt, deren Mitglieder bis in die dritte Generation verfolgt werden konnten. Da nach den bisherigen Untersuchungen die an AGS erkrankten Geschwister einer Familie in beiden Haplotypen HLA-identisch waren, mußten entsprechend dem autosomal rezessiven Vererbungsmodus dieser Krankheit alle diejenigen Angehörigen als heterozygot angesehen werden, die in einem Haplotyp HLA-identisch mit dem AGS-Patienten sind. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigten in der Abb. 7 alle Angehörigen mit einem, dem AGS-Patienten identischen HLA-Haplotyp auch einen erhöhten Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. im biochemischen Test. Es bestand somit eine 100 %ige Übereinstimmung in den Ergebnissen dieser beiden Methoden.

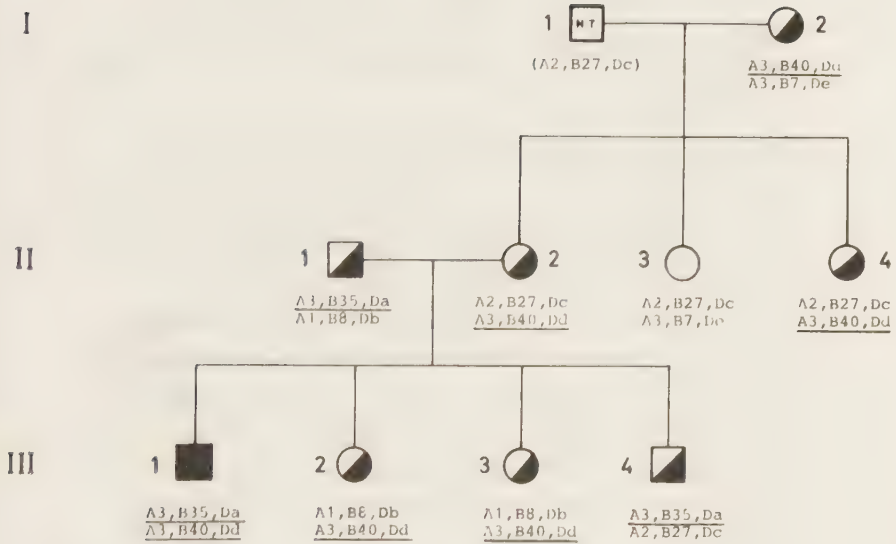


Abb. 7

Stammbaum der Familie WAL, in dem die Segregation des C 21-Hydroxylase Defektgens zusammen mit den HLA-Haplotypen gezeigt wurde.

Durch Unterstreichungen wurden alle diejenigen Angehörigen des AGS-Patienten hervorgehoben, die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem Patienten waren.

(○) = homozygot gesunde Personen entsprechend dem biochemischen Heterozygotentest

( ) = heterozygote Genträger entsprechend dem biochemischen Heterozygotentest

() = AGS-Patient (homozygot erkrankt)

() = Person nicht getestet

Alle Heterozygoten dieser Familie konnten sowohl durch die HLA-Typisierung wie durch den biochemischen Test zweifelsfrei als solche identifiziert werden.

Zum anderen konnte in dieser Familie sehr gut die Segregation des C 21-Hydroxylase Defektgens nachgewiesen werden. Entsprechend den Ergebnissen der beiden Untersuchungsmethoden war das mütterliche AGS-Defektgen mit dem Haplotypen A 3, B 40, Dd gekoppelt. Dieser Haplotyp - von der Großmutter geerbt - wurde von der Mutter an insgesamt 3 der 4 Kinder (III. 1, III. 2, III. 3) weitergegeben. Das 4. Kind (III. 4), welches ebenfalls als heterozygot erkannt wurde, erbte das Defektgen vom Vater, gekoppelt an den HLA-Haplotypen A 3, B 35, Da.

Ein weiteres Beispiel für die Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Methoden zur Erkennung der Heterozygoten wurde in Abb. 8 gegeben. Wie aus dieser Abb. ersichtlich, wurden die beiden, klinisch gesund erscheinenden Geschwister (III. 1 und III. 3) des AGS-Patienten sowohl mit Hilfe der HLA-Typisierung wie der des biochemischen Tests als heterozygote Genträger erkannt. Entsprechend den Ergebnissen der HLA-Typisierung wurde dabei das AGS-Defektgen von der Mutter gekoppelt an den Haplotypen A 2, B 7, D 2 - geerbt. Auf der anderen Seite wurden die Geschwister der Mutter (II. 3 und II. 4) sowie die Großmutter (I. 2) mit beiden Testmethoden übereinstimmend als "homozygot gesund" identifiziert.

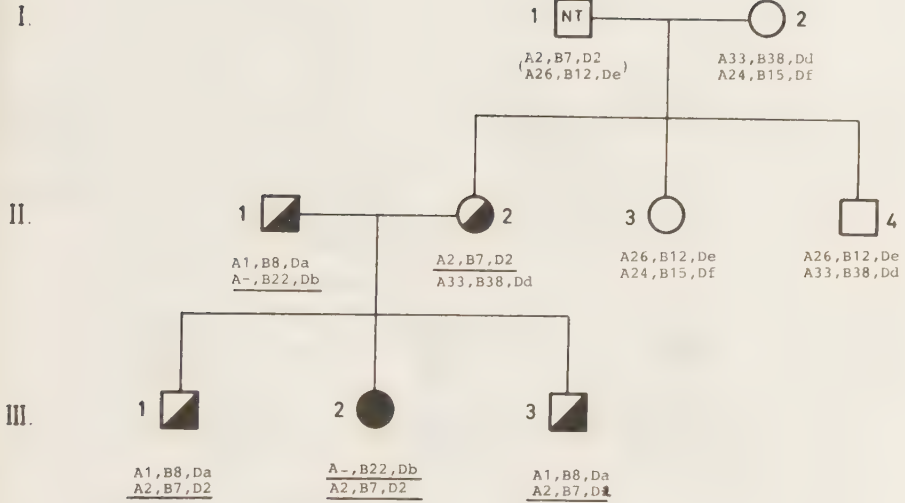


Abb. 8

Stammbaum der Familie EF, in dem die Segregation des C 21-Hydroxylase Defektgens zusammen mit den HLA-Haplotypen dargestellt wurden.

Durch Unterstreichung wurden alle diejenigen Angehörigen des AGS-Patienten hervorgehoben, die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem Patienten waren.

Zur Erklärung der weiteren Symbole siehe Abb. 7.

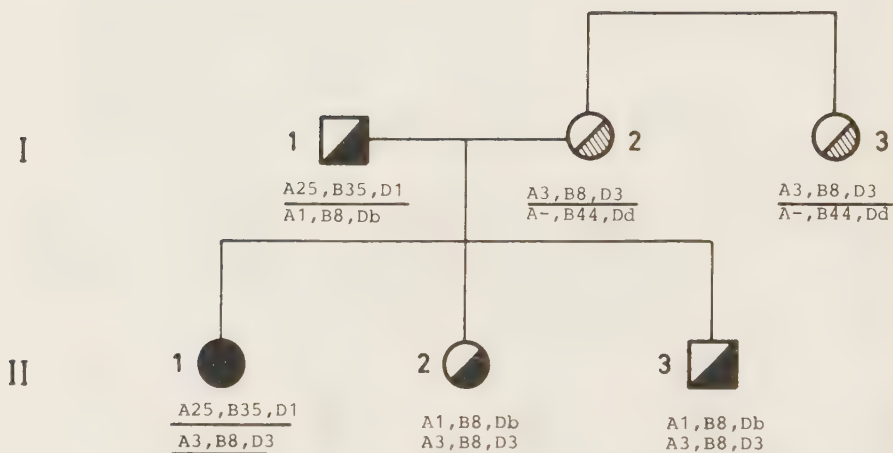


Abb. 9

Stammbaum der Familie WES, bei der sich Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests zur Erkennung der AGS-Heterozygoten zeigten.

Durch Unterstreichungen wurden alle diejenigen Angehörigen des AGS-Patienten hervorgehoben, die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem Patienten waren.

(●) = entsprechend der HLA-Typisierung mutmaßlicher AGS-Heterozygote, die jedoch negativ im biochemischen Test reagierten.

Zur Erklärung der weiteren Symbole siehe Abb. 7.

Diese Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests war jedoch nicht bei allen Familienanalysen zu finden. Ein Beispiel dafür wurde in Abb. 9 gegeben. Ausgehend von den beiden HLA-Haplotypen des AGS-Patienten mußte das mütterliche C-21-Hydroxylase Defektgen mit dem Haplotypen A 3, B 8, D 3 segregieren. Diese Annahme wurde auch bestätigt, indem die Geschwister des AGS-Patienten (II. 2 und II. 3), die beide diesen mütterlichen Haplotypen geerbt hatten, deutlich positiv in dem biochemischen Heterozygotentest reagierten. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch die Mutter selbst und deren HLA-identische Schwester nur einen grenzwertigen Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. nach Stimulation.

In der Tabelle 8 wurden die Ergebnisse der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests zur Erkennung der heterozygoten Genträger von allen untersuchten Angehörigen der AGS-Patienten zusammengefaßt. Nicht berücksichtigt wurden dabei die Eltern der AGS-Patienten, da diese per Definition als heterozygote Genträger anzusehen sind.

	HZT +	HZT -
HLA +	15	4
HLA -	0	7

* $p < 0.0025$ (Fisher's Exact Test).

Tabelle 8

Korrelation der Ergebnisse der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests (HZT) zur Erkennung der heterozygoten Genträger bei den Angehörigen der AGS-Patienten (n = 26)* .

Wie aus der Tabelle 9 zu ersehen, war bei nur 4 von insgesamt 26 Angehörigen eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der HLA-Typisierung und denen des biochemischen Tests aufgetreten. Bei diesen 4 Personen konnte auch bei wiederholter Testung kein erhöhter Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. nach der ACTH-Stimulation gemessen werden, obwohl sie nach der HLA-Typisierung (wegen eines gemeinsamen Haplotypen mit ihrem an AGS erkrankten Angehörigen) als heterozygot angesehen werden müssen.

Bei 15 Personen konnte dagegen die Diagnose "Heterozygot", und bei 7 Personen die Diagnose "Homozygot gesund" übereinstimmend mit beiden Methoden gestellt werden.

Bei der statistischen Auswertung mit Hilfe des FISHER-Exact-Tests (68) zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests zur Erkennung der heterozygoten Genträger ($p < 0.0025$).

Um zu prüfen, ob zwischen dem für den C 21-Hydroxylasemangel verantwortlichen Gen und einzelnen Antigenen des HLA-Systems ein Kopplungsungleichgewicht besteht, wurde die Verteilung der HLA-Determinanten von den unverwandten AGS-Patienten mit der von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die Verteilung der HLA-A, B, D Determinanten von den beiden Kollektiven wurde in Tabelle 9 zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem χ^2 -Test, wobei nach den Empfehlungen von SVEJGAARD und RYDER (73) der errechnete p-Wert zusätzlich mit der Anzahl der getesteten Antigene multipliziert wurde, um so zufällig sich ergebende Unterschiede bei dem Vergleich mehrerer Antigene zu eliminieren.

Entsprechend diesen Berechnungen zeigte sich bei unseren Untersuchungen eine statistisch signifikant erhöhte Frequenz des HLA-B 5 Antigens bei unseren AGS-Patienten mit einem "relativen Risikowert" (RR) von 5,8 gegenüber gesunden Kontrollpersonen.

	Controls	CAH	χ^2	RR	P value
<i>HLA-A</i>	(N = 1142)	(N = 21)			
1	26.1 ⁰ ₀	9.5 ⁰ ₀			
2	48.6	42.9			
3	33.0	61.9			
9	19.2	14.3			
10	11.6	4.8			
11	9.0	—			
28	6.3	9.5			
29	4.8	9.5			
30/31	3.2	4.8			
32	3.0	9.5			
<i>HLA-B</i>					
5	13.5	47.6	19.8	5.8	< .001
7	29.8	33.3			
8	17.9	4.8			
12	23.2	23.8			
13	6.8	—			
14	3.3	14.3			
15	11.3	19.0			
17	7.5	—			
18	8.0	4.8			
21	4.3	—			
22	3.4	4.8			
27	6.9	9.5			
35	16.9	19.0			
40	12.6	14.3			
<i>HLA-D</i>	(N = 200)	(N = 19)			
1	9.8	27.8			
2	20.7	16.7			
3	10.7	5.5			
9	6.2	5.5			

Tabelle 9

Vergleich der Verteilung von den einzelnen HLA-A, B und D-Allelen bei den AGS-Patienten und bei gesunden Kontrollpersonen.

RR = relatives Erkrankungsrisiko.

VI. Diskussion.

Unsere Ergebnisse der HLA-Typisierung bei einer großen Anzahl von AGS-Familien bestätigten das Konzept einer engen genetischen Assoziation zwischen dem HLA-System und dem AGS, welches zuerst von DUPONT et al. (30) beschrieben wurde. Erst kürztlich berichteten PRICE et al. (63), WEITKAMP et al. (79) und ZAPPACOSTA et al. (81) ebenfalls von solch einer engen Assoziation, so daß man heute mit großer Sicherheit annehmen kann, daß das Gen, welches für den Defekt der C 21-Hydroxylase verantwortlich ist, auf dem kurzen Arm des Chromosom Nummer 6 in unmittelbarer Nähe des HLA-Genkomplexes lokalisiert ist.

Bei der HLA-Typisierung unserer untersuchten Familien konnten wir keine Crossing-over zwischen den einzelnen Genorten finden. Andere Untersucher konnten jedoch durch den Nachweis von Rekombinationen die Lokalisation des AGS-Defektgens weiter eingrenzen. PRICE et al. (63) bestätigten den Befund von DUPONT et al. (30), daß das C 21-Hydroxylase Defektgen durch Rekombination von dem HLA-A-Genort abgetrennt werden konnte. Bei einer Familienanalyse fanden sie zwei Geschwister (eines an AGS erkrankt, das andere klinisch gesund), die genotypisch HLA-A-identisch, jedoch für die mütterlichen HLA-C und B-Determinanten verschieden waren (HLA-A:HLA-B,C-Rekombination). Bei dieser Familie konnten sie

nachweisen, daß das AGS-Defektgen zusammen mit dem HLA-B,C-Segment segregierte.

Ebenso beschrieben WEITKAMP et al. (79) eine Familie, bei der sich das gesunde Kind von dem an AGS erkrankten Kind durch eine Rekombination auf einem HLA-Haplotypen in dem HLA-B, Bf-Segment unterschied. Außerdem konnten LEVINE et al. (51) zeigen, daß durch Crossing-over eine Trennung des AGS-Defektgens von dem Glyoxylase-I-locus möglich war.

Alle diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß das C 21-Hydroxylase-Defektgen gekoppelt mit dem HLA-B, C, D-Segment vererbt wird. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dieses Defektgen in unmittelbarer Nähe des HLA-B-locus lokalisiert (Abb. 10).

Für eine enge Assoziation des AGS-Defektgens mit dem HLA-B-locus spricht auch die erhöhte Frequenz des Antigens HLA-B 5, die wir bei unseren AGS-Patienten gegenüber Kontrollpersonen fanden (Tabelle 9). ZAPPACOSTA et al. (81) berichteten, daß unter 8 getesteten AGS-Patienten 7 das Antigen HLA-Bw 35 aufwiesen. LEVINE et al. (51) konnten jedoch unter 34 unverwandten AGS-Patienten keine erhöhte HLA-Antigenfrequenz gegenüber Normalpersonen feststellen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die Zahl der untersuchten AGS-Patienten zu dem jetzigen Zeitpunkt noch zu klein, um über das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes zwischen dem AGS-

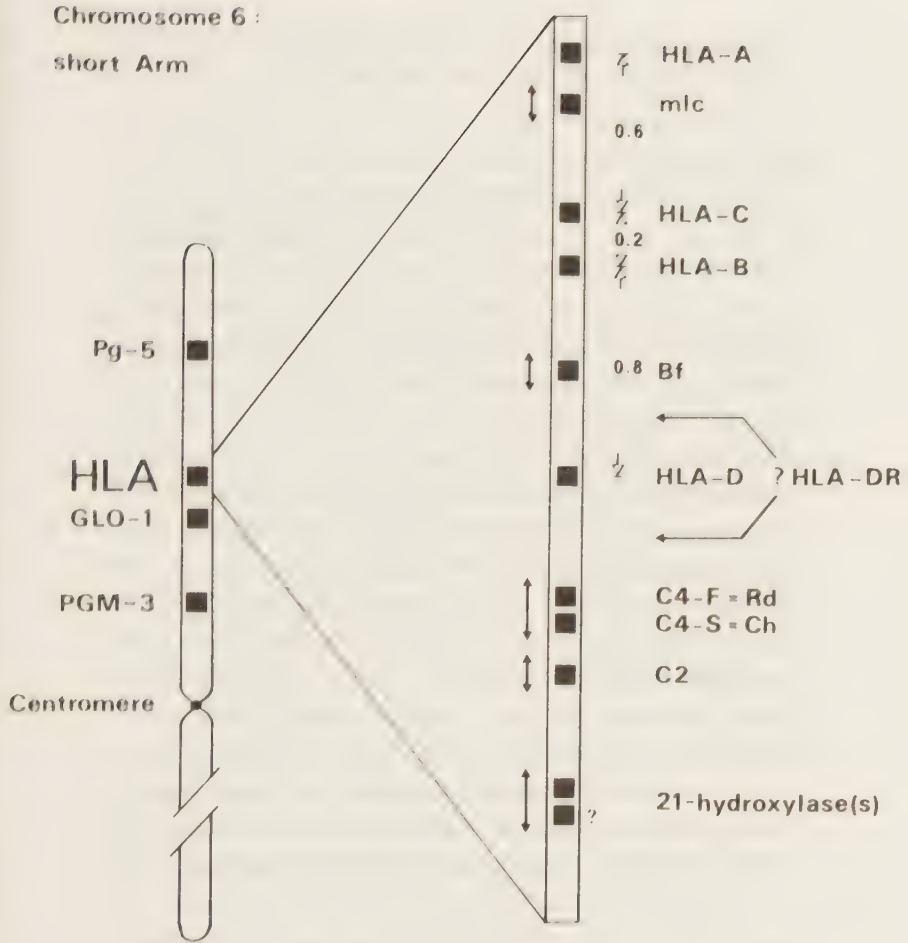


Abb. 10

Anordnung der Gene auf dem kurzen Arm des Chromosom Nummer 6 und mögliche Lokalisation des C 21-Hydroxylase Defektgens. (Abb. wurde dankenswerter Weise von Herrn Prof. GROSSE-WILDE zur Verfügung gestellt.)

Defektgen und einzelnen HLA-Determinanten eine gesicherte Aussage zu machen.

Bei einem Großteil der Krankheiten, die eine Assoziation zum HLA-Gen-System aufweisen, vermutet man als Ursache einen Autoimmunmechanismus. So war es erstaunlich, daß eine Krankheit wie das AGS, der eine angeborene Stoffwechselstörung der Steroidbiosynthese zugrunde liegt, ebenfalls eine Kopplung zum HLA-System zeigt. Es gibt jedoch Hinweise bei der Maus, die für eine Verbindung von H2-Region (ein dem menschlichen HLA-System analoger Genkomplex) und Steroidhormonsynthese sprechen. So konnte gezeigt werden, daß die H2-Region die Serumkonzentration und den Metabolismus des Testosterons beeinflußt (42). Da die Glucocorticosteroide für den gesamten Organismus wegen ihrer Wirkung auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung von großer Bedeutung sind, ist es schon denkbar, daß zwei so wichtige Funktionen wie die des HLA-Systems und die der Steroidsynthese gekoppelt vererbt werden.

Bei unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine sichere Erkennung der heterozygoten Genträger durch die HLA-Typisierung in den Familien mit AGS-Patienten möglich war. Es bestand eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der HLA-Typisierung und denen des biochemischen Tests zur Erkennung der Merkmalsträger (Tabelle 8). Bei den

4 Personen, bei denen eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Untersuchungsmethoden auftrat, könnte es sich entweder um falsch negative Resultate des biochemischen Tests oder um Crossing-over zwischen dem HLA-System und dem AGS-Defektgen handeln.

Wie schon in Teil B der vorliegenden Untersuchung gezeigt wurde, können ungefähr 10 bis 15 % der mutmaßlichen Heterozygoten biochemisch nicht als Merkmalsträger erkannt werden, da der Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. nach Stimulation im Bereich von gesunden Kontrollpersonen liegt. Im Gegensatz dazu ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen dem HLA-System und dem AGS-Defektgen sehr gering (nach unseren Berechnungen 0 bis 5 %), so daß es sich bei den 4 Personen mit großer Wahrscheinlichkeit um falsch negative Resultate des biochemischen Tests handelte.

Wegen dieser geringen Rekombinationsfrequenz kann man daher den Schluß ziehen, daß die Heterozygoten in Familien mit mindestens 1 AGS-Patienten am zuverlässigsten durch die HLA-Typisierung erkannt werden können. Alle die Angehörigen, die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem AGS-Patienten sind, müssen als heterozygote Genträger angesehen werden.

Im Gegensatz dazu ist bei all den Personen, bei denen keine direkten Angehörige an AGS erkrankt sind, die HLA-Typisierung kein Mittel, eine Heterozygotie festzustellen oder auszuschließen.

Bei diesen Personen ist solch eine Aussage allein mit Hilfe des biochemischen Testes möglich. Dies ist der Vorteil des biochemischen Testes gegenüber der HLA-Typisierung. Er kann ohne Familienanalyse und ohne größeren Aufwand an jeder beliebigen Person durchgeführt werden. Der Nachteil ist der, daß zur Zeit biochemisch noch nicht alle Merkmalsträger zweifelsfrei erkannt werden können.

Da die HLA-Determinanten schon auf den Amnionzellen nachzuweisen sind, ist durch die HLA-Typisierung eine pränatale Diagnostik des AGS in Risikofamilien möglich. Erst vor kurzem berichteten POLLACK et al. (60) erstmals über eine pränatale Diagnostik des AGS durch HLA-Typisierung bei 2 Familien mit je einem an AGS erkrankten Kind. Bei der einen Familie wurde aufgrund der HLA-Typisierung ein gesundes Kind angenommen, was sich nach der Geburt auch bestätigte. Bei der anderen Familie waren die HLA-Determinanten der Amnionzellen, die durch Amniozentese in der 16. Schwangerschaftswoche gewonnen wurden, identisch mit dem HLA-Muster der an AGS erkrankten Schwester. Der Verdacht, daß der Foet wie seine Schwester an AGS erkrankt war, konnte nach der Geburt biochemisch gesichert werden.

D. ZUSAMMENFASSUNG.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die heterozygoten Genträger für das AGS durch zwei Methoden - durch einen biochemischen Test und durch genetische Untersuchung mittels der HLA-Typisierung - sicher zu erkennen.

In dem biochemischen Test wurde der Anstieg des Plasma Cortisols, Androstendions, 17 α -Hydroxyprogesteron (17-OH-Prog.) und des Testosterons nach der i.v.-Gabe von ACTH bei insgesamt 71 mutmaßlichen heterozygoten Genträgern und 60 Kontrollpersonen radioimmunologisch bestimmt. Der ACTH-Test wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Test 1: Die ACTH-Stimulation erfolgte ohne medikamentöse Vorbehandlung.

Test 2: 1,5 mg Dexamethason (Dex.) wurden am Abend vor der ACTH-Stimulation verabreicht. Die ACTH-Stimulation erfolgte am nächsten Morgen um 9.00 Uhr. Frauen wurden nur zwischen dem 3. und 8. Tag ihres Menstruationszyklus getestet.

Von den 4 untersuchten Steroiden war die Bestimmung des Anstiegs des 17-OH-Prog. nach Stimulation der beste Parameter, um die heterozygoten Genträger von den Normalpersonen zu unterscheiden. In beiden Testen (Test 1 und 2) war der Anstieg des 17-OH-Prog. nach der ACTH-Gabe bei den AGS-Heterozygoten signifikant höher als bei den Normalpersonen ($p < 0,0005$).

Die Heterozygoten wurden biochemisch definiert durch einen Anstieg des 17-OH-Prog. nach Stimulation, der oberhalb von + 2 Standardabweichungen der 17-OH-Prog. Anstiege in den entsprechenden Kontrollgruppen lag.

Im Gegensatz zu den Männern konnte bei den Frauen die Erkennung der heterozygoten Genträger durch die Verabreichung von Dex. vor der ACTH-Stimulation (Test 2) verbessert werden. Alle untersuchten weiblichen Merkmalsträger (100 %) konnten in Test 2 als heterozygot erkannt werden. Dagegen konnten bei den untersuchten Männern in Test 1 und Test 2 nur 79 % bzw. 54 % der AGS-Merkmalsträger sicher als heterozygot erkannt werden.

Bei 91 Angehörigen aus 17 Familien mit mindestens 1 AGS-Patienten wurde neben dem biochemischen Test auch die Typisierung der HLA-A, B und D-Antigene durchgeführt. Bei den Familien mit 2 an AGS erkrankten Kindern waren die erkrankten Geschwister HLA-identisch. Dagegen unterschieden sich die klinisch gesunden Geschwister in all den untersuchten Familien in mindestens einem HLA-Haplotyp von dem erkrankten Angehörigen. Die Vermutung einer genetischen Kopplung zwischen dem HLA-System und dem C 21-Hydroxylase-Defektgen wurde durch die Berechnung der Lod Scores - welche ein statistisches Maß für die Enge der Assoziation zweier Genorte darstellen - bestätigt. Nach diesen Berechnungen ist das Gen, welches für den C 21-Hydroxylasemangel verantwortlich ist, auf dem kurzen Arm des Chromosom Nummer 6 in unmittelbarer Nähe des HLA-Gensystems lokalisiert (geschätzte Rekombinationsfrequenz 0 bis 5 %).

Entsprechend dem autosomal rezessiven Vererbungsmodus des AGS mußten alle diejenigen Angehörigen des AGS-Patienten als heterozygot angesehen werden, die in einem HLA-Haplotypen identisch mit dem AGS-Patienten sind.

Bei den Familienanalysen zeigte sich eine hoch signifikante Übereinstimmung in den Ergebnissen der HLA-Typisierung und des biochemischen Tests zur Erkennung der heterozygoten Genträger ($p = 0.0025$). Der überwiegende Teil der untersuchten Personen (74 %), die in einem Haplotypen HLA-identisch mit dem an AGS erkrankten Familienangehörigen waren, zeigten in dem biochemischen Test auch einen Anstieg des Plasma 17-OH-Prog. nach ACTH-Gabe oberhalb von + 2 SD der Normalpersonen.

Entsprechend den Ergebnissen dieser Untersuchung ist eine Erkennung der AGS-Heterozygoten in Familien mit mindestens 1 AGS-Patienten am sichersten durch die HLA-Typisierung möglich. Bei allen anderen Personen, die keinen an AGS erkrankten Patienten in ihrer Familie haben, ist eine Identifizierung der Merkmalsträger nur durch den biochemischen Test möglich.

E. LITERATURVERZEICHNIS.

- 1 ABRAHAM, G. E., ODELL, W. D., SWERDLOFF, R. S. and HOPPER, K.:
Simultaneous Radioimmunoassay of Plasma FSH, LH, Progesterone, 17-Hydroxyprogesterone, and Estradiol-17 B during the Menstrual Cycle.
J. clin. Endocr. 34 (1972) 312.
- 2 ALBERT, E. D. and GÖTZE, D.:
The Major Histocompatibility System in Man. In: The Major Histocompatibility System in Man and Animals.
Edited by Götze, D., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York (1977) 7.
- 3 ALBERT, E. D.:
Die Immunogenetik des Systems der menschlichen Leukozyten Iso-Antigene.
Habilitationsschrift Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (1972)
- 4 AMIEL, J. L.:
Hodgkin's disease and HL-A.
Transplant. Proc. 3 (1971) 1277.
- 5 AMOS, D. B. and BACH, F. H.:
Phe-notypic expressions of the major histocompatibility locus in man HL-A : Leukocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity.
J. exp. Med. 128 (1968) 623.

- 6 AMOS, D. B., SEIGLER, H. F., SOUTHWORTH, J. G. and
WARD, F. E.:
Skin graft rejection between subjects genotyped for
HL-A.
Transplantn Proc. 1 (1969) 342.
- 7 BACH, F. H. and HIRSCHHORN, K.:
Lymphocyte interaction: A potential histocompatibi-
lity test in vitro.
Science 142 (1964) 813.
- 8 BACH, F. H., ALBERTINI, R. J., KLOSTERMANN, H. and
DAY, E.:
Evaluation of compatibility at the major histocom-
patibility locus in man.
Histocompatibility Testing 55, Munksgaard, Copen-
hagen (1967).
- 9 BACH, F. H., ALBERTINI, R. J., AMOS, D. B., CEPPEL-
LINI, R., MATTIUZ, P. L. and MIGGIANO, V. C.:
Mixed leukocyte culture studies in families with
known HL-A genotypes.
Transplant. Proc. 1 (1969) 339.
- 10 BACH, F. H. and VOYNOW, K.:
One-way stimulation in mixed leucocyte cultures.
Science 153 (1966) 544.
- 11 BACH, F. H. and VAN ROOD, J. J.:
The major histocompatibility complex - genetics
and biology.
N. Engl. J. Med. 295 (1976) 806, 872, 927.

- 12 BAIN, B.:
Tritiated-thymidine uptake in mixed leucocyte cultures: Effect of specific activity and exposute time.
Clin. exp. Immunol. 6 (1970) 255.
- 13 BEITINS, I. Z., BAYARD, F., KOWARSKI, A. and MIGEON, C. J.:
The Effect of ACTH Administration on Plasma Testosterone, Dihydrotestosterone and Serum LH Concentrations in Normal Men.
Steroids 21 (1973) 553.
- 14 BERTRAMS, I.:
HLA-Antigene und Krankheitsempfänglichkeit.
Dtsch. med. Wschr. 101 (1976) 178.
- 15 BIDLINGMAIER, F. und KNORR, D.:
Immunologische Methoden der Steroidbestimmung.
Beckmann Report 1 (1972) 11.
- 16 BIDLINGMAIER, F., WAGNER-BARNACK, M., BUTENANDT, O. and KNORR, D.:
Plasma Estrogens in Childhood and Puberty under Physiologic and Pathologic Conditions.
Pediat. Res. 7 (1973) 901.
- 17 BLIZZARD, R. M., WILKINS, L.:
Present Concept's of Steroid Therapy in Virilizing Adrenal Hyperplasia.
Arch. Intern. Med. 100 (1957) 729.

- 18 BODMER, W. F.:
Evolutionary significance of the HL-A system.
Nature 237 (1972) 139.
- 19 BONGIOVANNI, A. M., EBERLEIN, W., GOLDMAN, A.,
NEW, M.:
Disorders of Adrenal Steroid Biogenesis.
Recent Progr. Hormone Res. 23 (1967) 375.
- 20 BONGIOVANNI, A. M., EBERLEIN, W.:
Defective Steroidal Biogenesis in Congenital
Adrenal Hyperplasia.
E. Mead Johnson Award Adresses.
Pediatrics 21 (1958) 661.
- 21 CEPPELLINI, R., MATTIUZ, P. L., SCUDELLER, G.
and VISETTI, M.:
Experimental allotransplantation in man. I. The
role of the HL-A system in different genetic com-
binations.
Transplantn Proc. 1 (1969) 385.
- 22 CHILDS, B., GRUMBACH, M. M., VAN WYK, J. J.:
Virilizing adrenal hyperplasia. A genetic and
hormonal study.
J. Clin. Invest. 35 (1956) 213.
- 23 DAUSSET, J.:
Iso-Leuco-anticorps.
Acta Haematol. (Basel) 20 (1958) 156.

- 24 DAUSSET, J. and SVEJGAARD, A., eds.
HLA and Disease.
Munksgaard, Copenhagen (1977).
- 25 DEGENHARDT, H. J., VISSER, H. V. A., WILMINK, R.,
CROUGHS, W.:
Aldosterone and cortisol secretion rates in infants
with congenital adrenal hyperplasia.
Acta endocr. (Kbh.) 48 (1965) 587.
- 26 DEGOS, L. and DAUSSET, J.:
Human migrations and linkage disequilibrium of
HL-A system.
Immunogenetics 3 (1974) 195.
- 27 DIAGNOSTIK AKTUELL:
HLA-System: Grundlage des genetischen Erkrankungs-
risikos.
Diagnostik 3 (1978) VIII.
- 28 DOERR, P. and PIRKE, K. M.:
Regulation of Plasma Oestrogens in Normal Adult
Males.
Acta endocr. (Kbh.) 78 (1975) 531.
- 29 DOERR, P. and PIRKE, K. M.:
Cortisol-Induced Suppression of Plasma Testoste-
rone in Normal Adult Males.
J. clin. Endocr. 43 (1976) 622.

- 30 DUPONT, B., OBERFIELD, E. E., SMITHWICK, E. M.,
LEE, T. D. and LEVINE, L. S.:
Close genetic linkage between HLA and congenital
adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency).
Lancet 2 (1977) 1309.
- 31 FIKENTSCHER, E. M.:
Über die Ausscheidung von Pregnantriol und Pregnan-
triolon im Harn unter ACTH-Stimulation beim konge-
nitalen adrenogenitalen Syndrom (AGS). Versuch ei-
nes Heterozygoten-Tests.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Univer-
sität München (1974).
- 32 GIVENS, J. R., ANDERSEN, R. N., RAGLAND, J. B.,
WISER, W. L. and UMSTOT E. S.:
Adrenal Funktion in Hirsutismus I. Diurnal Chan-
ge and Response of Plasma Androstenedione, Te-
stosterone, 17-Hydroxyprogesterone, Cortisol, LH
and FSH to Dexamethasone and 1/2 Unit of ACTH.
J. clin. Endocr. 40 (1975) 988.
- 33 GLEISPACH, H., BERGER, H., GLATZL, J., RÖSSLER, H.,
TSCHAGER, E.:
Pregnantriolon - Ausscheidung nach ACTH-Stimulie-
rung bei mutmaßlich heterozygoten Merkmalsträgern
eines 21-Hydroxylasendefektes.
Pädiatrie und Pädologie 6 (1971) 287.

- 34 GROSSE-WILDE, H.:
Genetik des HLA-D Systems und seine Beziehung
zu Krankheiten.
Habilitationsschrift Medizinische Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München (1977).
- 35 GUTAI, J. P., KOWARSKI, A. A. and MIGEON, C. J.:
The detection of the heterozygous carrier for
congenital virilizing adrenal hyperplasia.
J. Pediat. 90 (1977) 924.
- 36 HAMILTON, W.:
The nature of the enzyme defect in salt-losing
and non salt-losing forms of C²¹-hydroxylase
deficiency.
Acta Paediat. Scand. 61 (1972) 250.
- 37 HARMS, K., GRANDITSCH, G., ROSSIPAL, E., LUDWIG, H.,
POLYMERIDIS, Z., SCHOLZ, S., WANK, R. and
ALBERT, E. D.:
In: Coeliac Disease, (W. Tu, J. M. Hekker, and
A. S. Pena, eds.) H. E. Stenfert Kroese,
Leiden (1974) 215.
- 38 HARTZMAN, R. J., SEGALL, M., BACH, M. L. and
BACH, F. H.:
Histocompatibility Matching VI. Miniaturization
of the mixed leucocyte culture test: a preliminary
report.
Transplantation 11 (1971) 268.

- 39 HARTZMAN, R. J., BACH, M. L., BACH, F. H.,
THURMAN, G. B. and SELL, K. W.:
Precipitation of radioactively labeled
samples: A semi-automatic multiple-sample
processor.
Cellular Immunology 4 (1972) 182.
- 40 HIRSHFELD, A. J. and FLEISHMAN, J. K.:
An unusually high incidence of salt-losing
congenital adrenal hyperplasia in the Alaskan
Eskimo.
J. Pediat. 75 (1969) 492.
- 41 HOMOKI, J., FAZEKAS, A. T. and TELLER, W. M.:
Urinary Excretion of Pregnantriolone in Parents
of Children with 21-Hydroxylase Deficiency be-
fore and after Stimulation with Adrenocortico-
tropic Hormone. In: Lee, P. A., Plotnick, L. P.,
Kowarsky, A. A. and Migeon, C. J.,
Eds. Congenital Adrenal Hyperplasia, Baltimore
(1977) 479.
- 42 IVANYI, P., HAMPL, R., STARKA, L., MICKOVA, M.:
Genetic Association between H-2 Gene and Testo-
sterone Metabolism in Mice.
Nature 238 (1972) 280.
- 43 KASAKURA, S. and LOWENSTEIN, L.:
The effect of irradiation in vitro on mixed leuko-
cyte cultures and on leukocyte cultures with phyto-
haemagglutinin.
In: Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copen-
hagen (1965) 210.

- 44 KISSMEYER-NIELSEN, F., SVEJGAARD, A., AHRONS, S.
and NIELSEN, L. S.:
Crossing-over within the HL-A system.
Nature 224 (1969) 75.
- 45 KNORR, D. and BUTENANDT, O.:
Gas Liquid Chromatographic Investigations in
Homozygote and Heterozygote Persons with Con-
genital Adrenal Hyperplasia.
Acta Paediat. Scand. 58 (1969) 203.
- 46 KNORR, D., BIDLINGMAIER, F., BUTENANDT, O.,
VON SCHNAKENBURG, K. and WAGNER, W.:
Test for heterozygosity of congenital adrenal
hyperplasia.
In: Congenital Adrenal Hyperplasia. Edited by
Lee, A. P., Plotnick, L. P., Kowarsky, A. A.,
Migeon, C. J., Baltimore, University
Park Press (1975) 495.
- 47 KNORR, D., BIDLINGMAIER, F., BUTENANDT, O.,
VON SCHNAKENBURG, K. and WAGNER, W.:
A test for heterozygosity in congenital adrenal
hyperplasia.
Pediatr. Res. 9 (1975) 681.
- 48 KRENSKY, A. M., BONGIOVANNI, A. M., MARINO, J.,
PARKS, J. and TENORE, A.:
Identification of heterozygote carriers of congeni-
tal adrenal hyperplasia by radioimmunoassay of se-
rum 17-OH progesterone.
J. Pediat. 90 (1977) 930.

- 49a LAMM, L. U., SVEJGAARD, E. and KISSMEYER-NIELSEN, F.:
PGM₃: HL-A is another linkage in man.
Nature 231 (1971) 109.
- 49b LAMM, L. U., FRIEDRICH, U., PETERSEN, G. B.,
JORGENSEN, J., NIELSEN, J., THERKELSEN, A. J.
and KISSMEYER-NIELSEN, F.:
Assignment of the major histocompatibility
complex to chromosome no. 6 in a family with
a pericentric inversion.
Hum. Hered. 24 (1974) 273,
- 50 LEE, P. A., and GAREIS, F. J.:
Evidence for partial 21-hydroxylase deficiency
among heterozygote carriers of congenital adre-
nal hyperplasia.
J. clin. Endocr. 41 (1975) 415.
- 51 LEVINE, L. S., ZACHMANN, M., NEW, M., PRADER, A.,
POLLACK, M. S., O'NEILL, G. J., YANG, S. Y.,
OBERFIELD, S. E. and DUPONT, B.:
Genetic mapping of the 21-Hydroxylase-Deficiency
Gene within the HLA Linkage Group.
N. Engl. J. Med. 299 (1978) 911.
- 52 MANN, H. B. and WHITNEY, D. R.:
On a test of whether one of two random variables
is stochastically larger than the other.
Ann. Math. Statist. 18 (1947) 50.

- 53 MAUTHE, I., LASPE, H. und KNORR, D.:
Zur Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen
Syndroms (AGS): München 1963-1972.
Klin. Pädiat. 189 (1977) 1727.
- 54 MC DEVITT, H. O., BODMER, W. F.:
HL-A, immune-response genes, and disease.
Lancet 1 (1974) 1269.
- 55 MEMPEL, W., ALBERT, E. and BURGER, A.:
Further evidence for a Separate MLC-Locus.
Tissue Antigens 2 (1972) 250.
- 56 MEMPEL, W., GROSSE-WILDE, H., ALBERT, E. and
THIERFELDER, S.:
Atypical MLC reactions in HL-A typed related
an unrelated pairs.
Transplant. Proc. 5 (1973) 401.
- 57 NEUMANN, F., STEINBECK, H.:
Antiandrogene. Tierexperimentelle Grundlagen
und klinische Anwendungsmöglichkeiten.
Internist. 12 (1971) 198.
- 58 PHAM-HUU-TRUNG, M. T., RAUX, M. C., GOURMELEN, M.,
BARON, M. C. and GIRARD, F.:
Plasma aldosterone concentrations related to 17α -
Hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyper-
plasia.
Acta Endocr. (Kbh.) 82 (1976) 572.

- 59 PHAM-HUU-TRUNG, M. T., GOURMELEN, M., GIRARD, F.:
The simultaneous assay of Cortisol and 17α -Hydroxyprogesterone in the plasma of patients with CAH.
Acta Endocr. (Kbh.) 74 (1973) 316.
- 60 POLLACK, M. S., LEVINE, L. S., PANG, S., OWENS, R. P., NITOWSKY, H. M., MAURER, D., NEW, M. I., DUCHON, M., MERKATZ, I. R., SACHS, G., DUPONT, B.:
Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA-typing.
Lancet 1 (1979) 1107.
- 61 PRADER, A.:
Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms.
Helv. paediat. Acta 13 (1958) 426.
- 62 PRADER, A., ANDERS, G. J., HABICH, H.:
Zur Genetik des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms (virilisierende Nebennierenhyperplasie).
Helv. paediat. Acta 17, Fasc. 4/5 (1962) 271.
- 63 PRICE, D. A., KLOUDA, P. T. and HARRIS, R.:
HLA and congenital adrenal hyperplasia.
Lancet 1 (1978) 930.
- 64 QUAZI, Q., HILL, J., THOMPSON, M.:
Steroid Studies in Parents of Patients with Congenital Virilizing Adrenal Hyperplasia.
J. clin. Endocr. 33 (1971) 23.

- 65 QUAZI, Q. and THOMPSON, M.:
Incidence of salt-losing form of congenital
virilizing adrenal hyperplasia.
Arch. Dis. Childh. 47 (1972) 302.
- 66 RACE, R. R., SANGER, R.:
Blood Groups in Man.
Blackwell, Oxford (1975) 551.
- 67 RÖSLER, A., LEVINE, L. S., SCHNEIDER, B.,
NOVOGRODER, M. and NEW, M.:
The Interrelationship of Sodium Balance,
Plasma Renin Activity and ACTH in Con-
genital Adrenal Hyperplasia.
J. clin. Endocr. 45 (1977) 500.
- 68 SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,
(1969) 365.
- 69 SANDBERG, L., THORSBY, E., KISSMEYER-NIELSEN, F.
and LINDHOLM, A.:
Evidence of a third sublocus within the HLA
chromosomal region.
Histocompatibility Testing, P. I. Terasaki,
ed., Munksgaard, Copenhagen (1970) 165.

- 70 SCHALLER, J. G., OMENN, G. S.:
The histocompatibility system and human disease.
J. Pediat. 88 (1976) 913.
- 71 SOMEREN, H. VON, WESTERVELD, A., HAGEMEIJER, A.,
MEES, J. R. and MEERA KHAN, P.:
Human antigen and enzyme markers in man-Chinese
hamster somatic cell hybrids. Evidence for syn-
teny between the HL-A, PGM₃, ME₁, and IPO-B loci.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974) 962.
- 72 SVEJGAARD, A., PLATZ, P., RYDER, L. P., et al.:
HL-A and disease associations - a survey.
Transplant. Rev. 22 (1975) 3.
- 73 SVEJGAARD, A. and RYDER, L. P.:
Associations between HLA and disease. Notes on
methodology and a report from the HLA and
Disease Registry.
In: Dausset, J. and Svejgaard (eds.): HLA and
Disease, Munksgaard, Copenhagen (1977) 46.
- 74 TERASAKI, P. T., MC CLELLAND, J. D.:
Microdroplet assay for human cytotoxins.
Nature 204 (1964) 998.
- 75 TERASAKI, P. I., KREISLER, M. and MICKEY, M. R.:
Presensitization and Kidney Transplant Failure.
Postgrad. Med. J. 98 (1971) 100.

- 76 THORSBY, E.:
The Human major histocompatibility system.
Transplantn. Rev. 18 (1974) 51.
- 77 VERMEULEN, A. and VERDONCK, L.:
Radioimmunoassay of 17 β -Hydroxy-5 α -Androstan-
3-One, 4-Androstene-3, 17-Dione, Dehydroepian-
drosterone, 17-Hydroxyprogesterone and Proge-
sterone and its Application to Human Male Plasma.
J. Steroid Biochem. 7 (1976) 1.
- 78 WHO-Terminology
Report in Histocompatibility Testing, Munksgaard,
Copenhagen (1976) 5.
- 79 WEITKAMP, L. R., BRYSON, M. and BACON, C. E.:
HLA and congenital adrenal hyperplasia. Linkage
confirmed.
Lancet 1 (1978) 931.
- 80 YUNIS, E. J. and AMOS, D. B.:
Three closely linked genetic systems relevant to
transplantation.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68 (1971) 3031.
- 81 ZAPPACOSTA, S., DE FELICE, M., LOMBARDI, G.,
MINOZZI, M., VALENTINO, R. and VANACORE, G.:
HLA and congenital adrenal hyperplasia.
Lancet 1 (1978) 524.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. BETKE, Direktor der Universitäts-Kinderklinik München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. D. KNORR, Leiter der Endokrinologischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik München, für die Vergabe des Themas, für sein Interesse an dem Fortgang der Untersuchung und für all die Ratschläge und Unterstützung im Verlauf meiner Arbeit. Neben den theoretischen Gesprächen war für mich seine Anleitung, sich praktisch mit endokrinologischen und allgemein-pädiatrischen Problemen auseinanderzusetzen, eine ganz große Bereicherung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. F. BIDLINGMEIER, Leiter der klinischen Chemie der Universitäts-Kinderklinik München, danke ich für seine Hilfe im Labor und seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Für die anregenden Diskussionen und Vorschläge, welche die vorliegende Arbeit entscheidend geprägt haben, danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. GROSSE-WILDE, jetzt Leiter des Instituts für Medizinische Virologie und Immunologie des Universitäts-Klinikums Essen.

Mein Dank gilt ebenfalls den Medizinisch-technischen Assistentinnen des endokrinologischen Labors der Universitäts-Kinderklinik München, Frau M. BREPSON, Frau E. GROVE, Frau S. ROHRSCHEIDER, Frau C. WOHLFAHRT, Frau E. WOLF, für die schnelle und zuverlässige Bestimmung der dieser Arbeit zugrunde liegenden biochemischen Parameter.

Lebenslauf

Geboren am 06.02.1949 in Rothenburg o.d. Tauber als Sohn des selbständigen Kaufmanns Walter Weil und der Diplom-Volkswirtin Dr. Ursula Weil, geb. Schäfer.

Nach den vier Grundschuljahren Besuch des "Heinrich-von-Gagern-Gymnasiums" in Frankfurt/Main von 1959 bis 1967 (Reifezeugnis vom 15.06.1967).

Studium der Medizin an der Universität München vom Sommersemester 1969 bis Sommersemester 1975.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung: 09.04.1970

Ärztliche Vorprüfung: 05.10.1971

Ärztliche Prüfung: 29.07.1975

Nach der einjährigen Medizinalassistentenzeit an dem Krankenhaus rechts der Isar der TU München (Innere Medizin), dem Krankenhaus München-Schwabing (Pädiatrie) und dem Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck (Chirurgie) Approbation als Arzt am 14.03.1977.

Wissenschaftlicher Assistent (Stiftung Volkswagenwerk) an der Kinderklinik der Universität München, Abteilung für pädiatrische Endokrinologie, vom Mai 1977 bis Juli 1979. Fertigstellung der vorliegenden Dissertation vom August 1979 bis Januar 1980.

Assistenzarzt (Senior House Officer) am Bristol Maternity Hospital, Bristol/England (Abteilung für Neonatologie und Abteilung für Geburtshilfe) vom Februar 1980 bis Februar 1981.

